

Membranfiltergesellschaft

Sartorius-Werke Aktiengesellschaft & Co.

Göttingen, Weender Landstraße 96-98

Fernsprech-Nummer 2129 · Postfach 142
Drahtwort: Membranfilter Göttingen
Bank: Commerzbank A.-G., Filiale Göttingen
Postscheckkonto: Hannover Nr. 61223



Vorläufige Mitteilung über die Färbung der Bakterien auf den Membranfiltern.

Von Dr. A. Bellng

Die Membranfilter nach Prof. Zsigmondy sind schon im Laufe der letzten 20 Jahre für verschiedene Zwecke auf verschiedenen Gebieten angewandt worden.

In der Mikrobiologie sind die Membranfilter hauptsächlich für die Sterilisierung eingeführt, um verschiedene Flüssigkeiten keimfrei zu machen. In dieser Frage wurden sehr viele wissenschaftliche Arbeiten durchgeführt. *)

Im Jahre 1943 wurde eine ganz neue Methode mit Hilfe von Membranfiltern für Wasseruntersuchung angewandt. *) Die Aufmerksamkeit wurde nicht auf das Filtrat, sondern auf den Filterrückstand gerichtet, um Bakterien, die auf dem Filter zurückgeblieben sind, zu untersuchen. Man hat das Filter mit zurückgebliebenen Bakterien nach der Wasserfiltration auf den Nährboden-Endo gelegt und Colibakterien gezüchtet. Das Wachstum der Bakterien auf dem Filter ging ziemlich schnell und nach 12-16 Stunden waren die Kolonien ganz klar zu sehen. Diese Methode hat einen besonderen Vorzug; sie gibt die Möglichkeit, große Mengen verschiedener Flüssigkeiten zu untersuchen.

Aber es gibt noch eine andere Möglichkeit, die Bakterien, die im Filterrückstand geblieben sind, zu untersuchen.

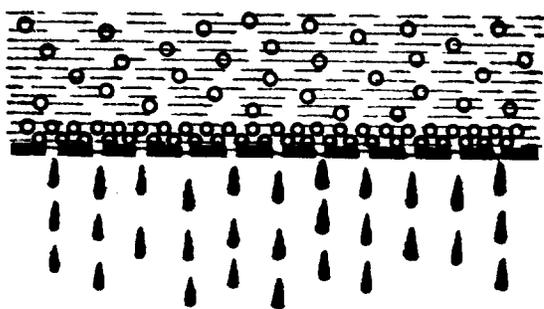
Man kann das Filter nach der Filtration einfach färben, trocknen, mit Cederöl durchsichtig machen und mikroskopieren. *)

Um z. B. festzustellen, wieviel Bakterien und andere Mikroorganismen in 1 cm³ Trinkwasser enthalten sind, filtriert man 1 cm³ Wasser durch das Membranfilter Nr. 5, trocknet, legt das Filter in eine Petrischale mit Filterpapier, das mit 1%-iger Erythrosinlösung angefeuchtet ist. Nach 1/3 Std. legt man das Filter wieder in den Filtrierapparat, spült mit dest. Wasser, trocknet, schneidet ein Stück vom Filter aus und legt es auf den mit Cederöl benetzten Objektträger. Die obere Seite des Filters betropft man ebenfalls mit Cederöl, bedeckt es mit einem Deckglas, mikroskopiert wie üblich mit Oelimmersion und zählt die Bakterien in 1 mm² aus; berechnet durch Multiplikation mit der Filterfläche in qcm (Filterfläche = r²π, r in cm ausgedrückt), und daraus wieder die Zahl der in 1 cm³ Wasser enthaltenen Bakterien. Durch diese Methode erhält man eine größere Zahl von Bakterien, als mit der gewöhnlichen Kochmethode.

Es wurde mit dieser Färbemethode ausprobiert, die Tuberkelbazillen auf dem Membranfilter zu färben. Ein ganz sicheres positives Sputum, mit Antiformin behandelt, wurde durch das Membranfilter Nr. 5 mit Porengröße 0,7 μm filtriert, getrocknet, in eine Metallschale auf mit Karbolfuchsin getränktem Filterpapier gelegt und bis zum Kochen erhitzt (3-5 Minuten). Danach mit 5%-igem HCL Alkohol im Filtrierapparat entfärbt, mit dest. Wasser durchgespült und getrocknet. Aus dem getrockneten Filter schneidet man ein Stück heraus und arbeitet nach der oben beschriebenen Methode weiter. Die Tuberkelbazillen sind rot bis violett gefärbt und ganz klar zu sehen. Das Feld ist hell und deswegen braucht man keine Nachfärbung. Durch diese genannte Färbung kann man im Laufe von 3-4 Stunden die Tuberkelbazillen in verschiedenen Untersuchungsmaterialien feststellen. Es ist interessant zu bemerken, daß in positivem Sputum nach der Zentrifugierung (3000 Touren, 15 Minuten) im Zentrifugat nach der Filtration durch das Membranfilter Tbc mit dieser Färbemethode nachgewiesen wurden. Zwei Sputen waren nach der gewöhnlichen Methode negativ, aber mit der Membranfiltermethode im Sediment und Zentrifugat wurden einzelne rote Stäbchen als sehr verdächtig auf Tbc festgestellt.

Literaturverzeichnis

1. Membranfilter nach Prof. Zsigmondy. Verzeichnis der Literatur 1944.
(Membranfiltergesellschaft Göttingen)
2. Prof. Grossmann und Dr. Beling: „Über ein Verfahren des Nachweises von Colibakterien und Angehörigen der Typhus-Paratyphusgruppe in Trinkwasser mit Hilfe von Membranfiltern (M. F. Methode).“
(Membranfiltergesellschaft Göttingen)
- Prof. Schütz und Kruse: „Eine neue Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Bakterien in Flüssigkeiten.“
(Klinische Wochenschrift 1943. N 32/33)
- Dr. G. Müller: „Typhus und Trinkwasser.“
(Medizinische Klinik. Heft 8 Sept. 1946)
3. Barsof Microbiology (1937) vol. IV (russisch)



*Thus filter
the membrane-filters
after Prof. Zsigmondy!*

The membrane-filters

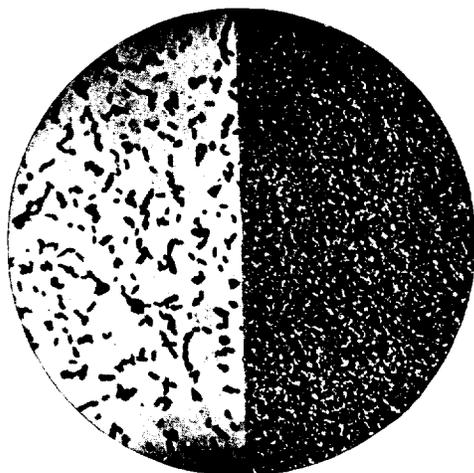
are sieves, with straining effect, and not absorption-filters, such as those made of paper, asbestos, clay, glass or ceramics, which retain substances in the filtering material.

The membrane-filters

are produced in every degree of porosity. Such fineness and exactitude is impossible with any other filtering material.

The membrane-filters

may be used repeatedly for different filtrations. The residue is retained quantitatively and may easily be removed from the surface of the filter.



Filters made in accordance with the patents of the Nobel Prize winner, Prof. Zsigmondy, are thin, homogeneous cellulose membranes.

The accompanying microphotograph depicts the even and extremely close alignment of the pores, which is unobtainable with other types of filters.

The membranefilters are available in every degree of porosity for aqueous and organic solutions.

The following kinds of membrane-filters are available:

1. **Membrane-filters** after Prof. Zsigmondy-Bachmann for aqueous solutions.
2. **Ultra-fine filters** after Prof. Zsigmondy, for aqueous solutions.
3. **Cella-filter** after Zsigmondy-Kratz, for organic solutions.
3. **Ultra cella-filter** after Zsigmondy-Zakowski, for organic solutions.

For special researches black **membrane-filters** may be had.

All filters may be made extremely strong with batiste or other inserts.

The filters are suitable for all kinds of filtration, such as:

Ultra-Filtration and Electro-ultra filtration.

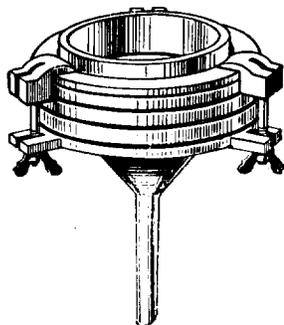
Dialysis and Electro-dialysis.

Osmosis and Electro-osmosis.

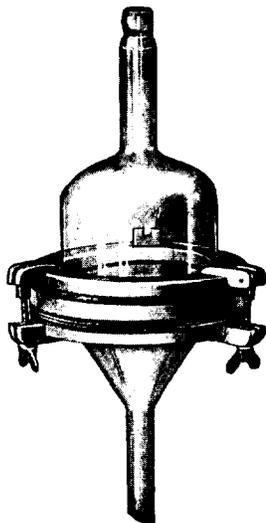
The membrane-filters are used for all types of research in science and industry, especially:

Government and private research laboratories; industrial laboratories, e. g. cement, clay, ceramics, glass, textile and sugar industries, etc.; bacteriological and serological institutions; laboratories of the pharmaceutical industry and dispensaries; laboratories for water and soil examination; breweries, vineries, mineral water plants, etc.

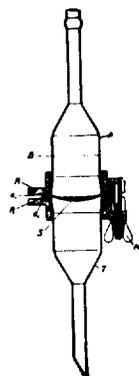
Filtration Apparatus with Membrane-Filters for Laboratories and Industry.



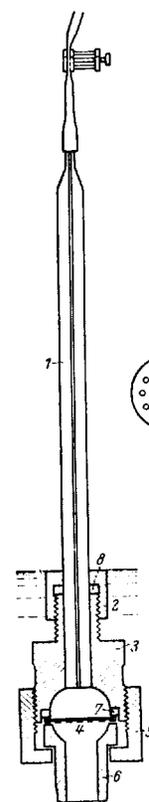
Funnel apparatus PA 9, 15 and 30 cm. dia. filters of glass and porcelain (see folder PA 37).



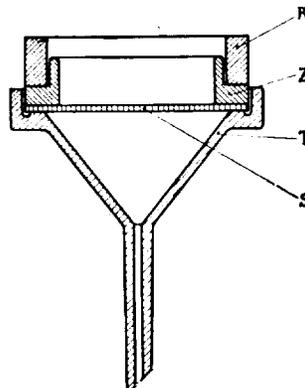
Glass Funnel Apparatus GD for pressure filtration up to about 4 atm., for 9 and 15 cm. dia. filters (see folder PA 37).



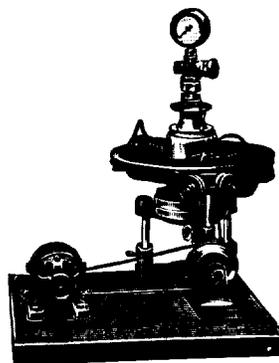
Thiessen's Apparatus for Vacuum and Pressure Filtration up to 5 atm., for small quantities, for 4 cm. dia. filters (see special folder).



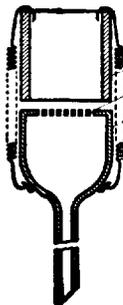
Osmometer after Krogh for measuring osmotic pressures; especially of physiological solutions (see special folder).



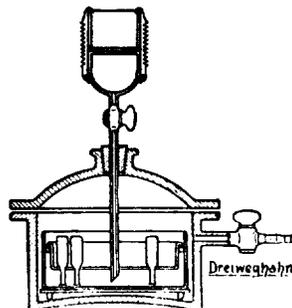
Simplified Filtration Apparatus VA 9 for 9 cm. filters (see folder VA 36).



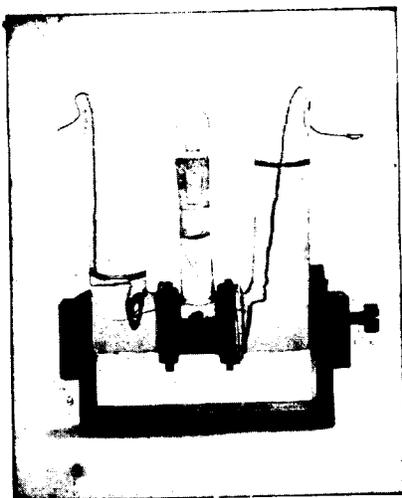
Standard High Pressure Apparatus for large quantities up to 125 atm., for filters of 9 cm. dia. (see folder Hodru 9).



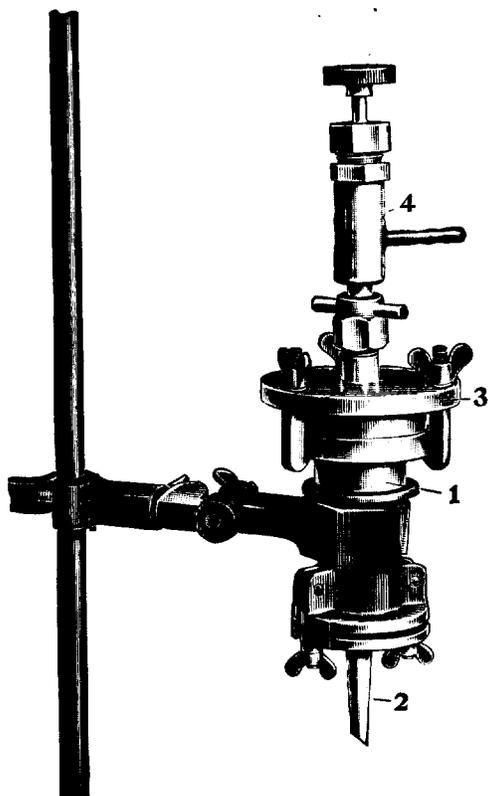
Filtration Apparatus for Sterile filtration „Stefi“ for 4 and 9 cm. dia. filters (see folder Stefi 34).



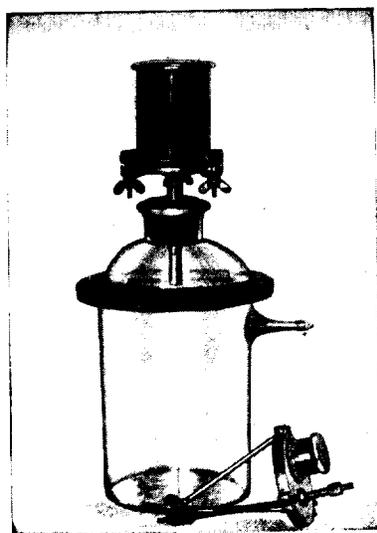
Ampoule Filling Apparatus „Amfü“ (see folder Amfü 35).



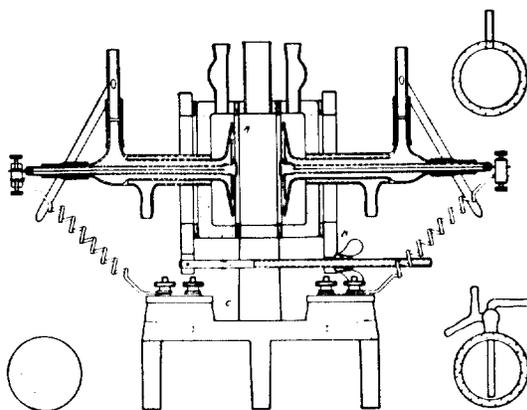
Electro-Dialysator after Heyne for the electro-dialysis of smallest quantities, especially for the quantitative determination of alkalis in acids, insoluble in water (see special folder).



Bacterial Apparatus up to 12 atm. (see special folder).



E. K. Metal Filter for Pressure-Filtration up to 5 atm. and vacuum for 6 cm. dia. filters, chromium or nickel-plated (see folder E. K. 36).



Uni-Apparatus after Prof. Manegold for Dialysis, Electro-Dialysis, Filtration, Electro-Filtration, Osmosis and Electro-Osmosis for 9 cm. dia. Filters (see special folder).



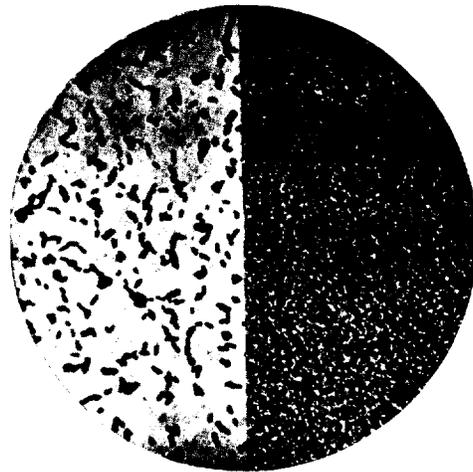
Membrane Filters

after Prof. Zsigmondy.

For aqueous solutions:

Membrane Filters

Ultrafine Filters



For organic solutions:

Cella Filters

Ultracella Filters

Membrane Filters with typhus-bacteria. (Type of a sieve-filter of **absolutely dependable** filtering action, as the bacteria are larger than the pores of the filter and must, for that reason, necessarily remain upon the filter surface.)

The uncommon uniformity of the structure of the Membrane-Filter in comparison with the other filter structures should be noted.

Membrane Filters.

Sieve action of membrane filters.

The membrane filters, which are manufactured after Prof. Zsigmondy's special process, are made of very thin, homogeneous gelatin layers. The frame work consists of cellulose esters, or cellulose.

The cavity system of the gelatinous mass is composed of pores whose size varies over a wide range. They are in every order of magnitude.

The cavities act in the same manner as the holes of a sieve.

All particles larger than the pores of the membrane are retained during the filtration. They form a layer which can be wiped off the glazed surface of the membrane. All particles smaller than the pores of the membrane pass through freely. If it is desired to carry out a fractional filtration, these small particles can be filtered off using a membrane filter of finer porosity. The sieve action of the membrane therefore depends on the ratio of the size of the particles to the size of the pores.

In cases of filtration and dialysis where cellulose, asbestos, paper, porcelain, and glass filters of the finest porosity are too coarse, membrane filters exert their sieve action on particles of molecular size.

There is a sharp distinction between the **adsorptive** purifying action of pressed or granulated adsorption media (cellulose, asbestos, carbon etc.), and the **sieve** action of membrane filters.

The relatively coarse cavity system of such media can only retain large particles by sieve action. All small particles pass through freely, unless they are adsorbed on the inner or outer surfaces of fibers or grains. The purifying effect ceases as soon as the quantity of material adsorbed approaches the saturation value of the adsorbent.

It is impossible to predict precisely when impure liquid will begin to come through. Great care must, however, be taken to replace the filtration layer shortly before exhaustion. An exhausted layer of adsorbent is either rejected or regenerated by a special process.

Summary.

The membranes of graded permeability act as inexhaustible sieves which can be wiped easily. This property permits quantitative determination of the filtrate as well as of the residue on the filter.

Adsorptive media, on the other hand, possess a rather coarse cavity system. Their filtering effect on smaller particles depends on their capacity to adsorb, which ceases as soon as the saturation value is approached. In contrast to membrane filtration, it is very

tedious and time consuming to recover quantitatively the substance retained in the adsorbent.

In every real filtration a residue is formed which gradually decreases the speed of filtration. By removing this layer the speed of filtration can be increased. It is possible to counteract the retarding tendency from the very beginning by thoroughly stirring the solution.

Types of Filters.

The filters are classified into four groups:

1. **Membrane Filters** after Zsigmondy-Bachmann for aqueous solutions.
2. **Ultrafine Filters** after Zsigmondy for aqueous solutions.
3. **Cellafilters** after Zsigmondy-Kratz for organic solutions.
4. **Ultra Cellafilters** after Zsigmondy-Zakowsky for organic solutions.

Special Filters.

- a) For quantitative residue determinations Membrane Filters as well as Cella Filters can be obtained either opaque white or black.
- b) For large scale technological purposes specially stabilized Membrane and Cella filters are manufactured.
- c) For bacteriological work we manufacture a bacteria proof filter of known maximum porosity.
- d) For albumen filtrations we make filters which are benzo-purpurin and congo red proof.

Range of Application of the Filters.

The filters can be used for analytical, preparative, bacteriological, and serological work as well as for the large scale technological purification of water, organic liquids etc.

The filters are used in the following operations:

- a) Filtrations, Ultrafiltrations, and Electroultrafiltrations.
- b) Dialysis and Electro-Dialysis.
- c) Osmosis and Electro-Osmosis.

Who Uses the Filters?

The great variety of customers in all parts of the world corresponds to the manifold applicability of the Zsigmondy filters.

They are supplied to:

Governmental and private research laboratories.
Industrial laboratories in various fields, such as:

Cement, clay, ceramics, glass, textile, and sugar.
Pharmacies and pharmaceutical industrial laboratories.
Laboratories for water and soil investigations.
Breweries and cider, soda and mineral water factories.

Properties of the Filters.

1. Membrane Filters are opaque white and possess a glazed surface.
2. Ultrafine Filters are transparent to clear, and also possess a glazed surface.
3. Cella Filters are opaque and smooth but have a gummy texture.
4. Ultracella Filters, like Ultrafine Filters, are transparent to clear, but have a gummy texture.

The following comments concerning the resistance of the filters against various chemical reagents should be noted:

Membrane and Ultrafine Filters can only be used with water and aqueous solutions.

These filters will withstand:

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Nitric Acid | up to 25% |
| Sulphuric Acid | " " 20% |
| Hydrochloric Acid | 20—25% |
| Caustic Soda or Caustic Potash | 1—3% |
| Ammonia | up to 8% |

They cannot be used for work with organic solvents or solutions containing such substances as acetone, ether, or chloroform. Membrane Filters may be washed with dilute alcohol, and they can also be used for short filtrations of alcoholic solutions.

Ultrafine Filters will resist alcohol.

Cella and Ultracella Filters can be employed for all ordinary organic solvents. Some solvents (e. g. alcohol) harden the filters and alter their appearance to a slight extent, without, however, changing the porosity in any way. They withstand 4—5% alkali solution.

It is often desired to use the filters whose cavity system is filled with water for the filtration of a solvent A which is immiscible with water. In such cases it is necessary to displace the water from the capillary system by a solvent B which is miscible both with water and with solvent A. Usually alcohol is used for this purpose.

All types of filters with the exception of the Ultrafine Filters may be completely dessicated. Membrane Filters shrink to such a small extent that they can dry out without tearing while being clamped in the filtration apparatus. Cella and Ultracella Filters, however, shrink considerably in drying and break easily.

Dessicated filters regain their original form, elasticity and porosity on being immersed in water or some other solvent. Ultrafine Filters are destroyed by complete dehydration.

Grades of Permeability, Time of Filtration, and Sieve Effect of the Filters.

Upon request the time of filtration (Z) is marked on the filter. (Z is the time required for the filtration of 100 cc. of distilled water at room temperature, through a filtering surface of 100 sq. cm. under 1 atm. excess pressure.)

The value of Z is stamped on the edge of the filter.

According to the time of filtration the following degrees of permeability are distinguished:

Membrane Filters and Cella Filters.

„coarse“ Z = 1—9 seconds
 „medium“ Z = 10—29 “
 „fine“ Z = 30—100 “
 „finest“ Z = more than 100 sec.

N. B. Membrane Filters „finest“ are furnished only upon request, because the Ultrafine Filter „coarse“ is of approximately the same porosity as the Membrane Filter „finest“.

Ultrafine Filters and Ultracella Filters.

„coarse“ Z = 1—9 minutes
 „medium“ Z = 10—29 “
 „fine“ Z = 30—100 “
 „finest“ Z = more than 100 min.

To indicate the degree of permeability the following letters are stamped on the edge of the filter:

g (coarse), **m** (medium), **f** (fine), **ff** (finest).

The following valuable observations were made in the fields of application of the filters. These observations further characterize the different degrees of permeability.

Membrane Filters and Cella Filters.

| Degree of Permeability | Solutions Filtered | Average Pore Diameter |
|------------------------|--|-------------------------------------|
| „coarse“ | caolin suspensions and similar solutions; flocculent hydroxides; yeast etc. | 3—0.5 μ ($\mu = 1/1000$ mm) |
| „medium“ | BaSO ₄ precipitated in the cold; AgCl: fine hydroxides. Suitable for analytical and bacteriological work. | 1—0.1 μ |

| Degree of Permeability | Solutions Filtered | Average Pore Diameter |
|---|--|---|
| „fine“ | Ranging from finer to coarser colloidal gold solutions. | from 1 μ to approx. 50 m μ (m μ = $\frac{1}{1000000}$ mm). |
| „finest“ resp. Ultrafine Filter „coarse“. | Fine colloidal gold solutions Colloidal Silicic Acid. | 100 - 20 m μ |

Ultrafine Filters and Ultracella Filters.

| Degree of Permeability | Solutions Filtered |
|------------------------|--|
| „coarse“ | Fine Gold particles, coll. silicic acid in the process of analysis |
| „medium“ | Finest gold particles, dyes of the benzo-purpurin class |
| „fine“ | coarser albumen particles, suitable for osmosis |
| „finest“ | Finest colloids, congo red, albumen. |

Tested filters are furnished for work where a more precise knowledge of the maximum porosity is desired. The filters are tested by a special method. We determine the maximum porosity only for filters whose pore diameter ranges from 3 μ to 0,3 μ . Upon request we determine whether Ultrafine and Ultracella Filters are impervious to a 2% congo red solution or an 0,2% benzo purpurin solution. Experience has shown that congo red proof filters also retain albumen.

How to Store the Filters.

All filters should be kept moist. This is done best in Petri dishes, glass bowls, or copper boxes containing distilled water to which a few drops of a suitable disinfectant has been added. We recommend formaldehyde, activin and others which have to be selected depending on the sort of work for which the filter is to be used. It is also sufficient to put a piece of copper (e. g. a copper coin) into the container, as this metal is strongly disinfectant. Thus the growth of bacteria in the water and on the filters is prevented. For this reason we also keep copper boxes in stock, which are suitable for the transportation as well as the storage of the filters.

Packing the Filters.

The filters are usually mailed, packed between moist filter papers enclosed in a guttapercha envelope. Shipping in copper and aluminum boxes has proved most convenient. These boxes may also be used to store the filters. The copper boxes have either a simple lid or an air and water tight cover.

The aluminum boxes have a glass dish inside and are closed with a screw cover. The glass dish is covered with a rubber washer on which an aluminum cover rests. This aluminum cover, in turn, is pressed down by the outer screw cover.

Assortments and Packages.

The filters are furnished either single, in assortments, in packages, or in any desired quantity. (Please give diameter).

An assortment consists of 12 filters of the requested group, namely:

| | | |
|---|-------------------------|----------|
| 3 | filters of permeability | „coarse“ |
| 3 | „ „ | „medium“ |
| 3 | „ „ | „fine“ |
| 3 | „ „ | „finest“ |

In supplying Membrane Filters — if not specified otherwise, we include 3 Ultrafine Filters „coarse“, instead of 3 Membrane Filters „finest“.

A package consists of:

- 1 assortment each of the 4 groups of filters in the above mentioned degrees of permeability.
- 6 tested filters of various maximum porosities.
- 3 congo red tested, albumen proof filters, which can only be supplied up to 15 cm diameter.

Please Note!

Our Membrane Filters can also be used advantageously for qualitative and preparative work in porcelain suction filters, Buchner funnels, and rapid filtration apparatus with sieve cone. They can be applied in ordinary filtrations as well as in continuous filtration processes

The cable address of these list:
„Filen 36“

Prices from factory except postage and packing perviousness:
Membrane-filters of every degree of

| Nr. | Diameter | without enclosures | | gauged without enclosure piece | with enclosure piece |
|-------|----------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------|
| | | Piece | assortment 12 pieces | | |
| | | Code-W. | Code-W. | Code-W. | Code-W. |
| M 500 | 500 mm | ulmeg | — | — | elmeg |
| M 300 | 300 " | ulmed | ulmod | uleid | elmed |
| M 150 | 150 " | ulmez | ulmoz | uleiz | elmez |
| M 90 | 90 " | ulmen | ulmon | ulein | elmen |
| M 75 | 75 " | ulmes | ulmos | uleis | elmes |
| M 65 | 65 " | ulmef | ulmof | uleif | elmef |
| M 60 | 60 " | ulmek | ulmok | uleik | elmek |
| M 40 | 40 " | ulmer | ulmor | uleier | elmer |

With enclosure will mean: stabilized filters.
 Black Membranfilter cost as much as white membranefilters plus 10% advance.
 Prices of packing will be stated if asked for.

Cella-filters of every degree of perviousness:

| | | | | | |
|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| C 300 | 300 mm | ulced | elced | eiced | elced |
| C 150 | 150 " | ulcem | elcom | eicem | elcem |
| C 90 | 90 " | ulcen | elcon | eicen | elcen |
| C 75 | 75 " | ulces | elcos | eices | elces |
| C 65 | 65 " | ulcef | elcof | eicef | elcef |
| C 60 | 60 " | ulcek | elcok | eicek | elcek |
| C 40 | 40 " | ulcer | elcor | eicer | elcer |

Ultrafine-filters of every degree of perviousness

| | | | | | |
|-------|----------------|-------|-------|----------------------------------|--|
| U 300 | 300 mm | ulfid | ulfod | gauged tested on albumen density | Ultrafinefilters and Ultra-Cellafilters with enclosure can be manufactured if asked for. |
| U 150 | 150 " | ulfim | ulfom | uldim | |
| U 90 | 90 " | ulfin | ulfon | uldin | |
| U 75 | 75 " | ulfis | ulfos | uldis | |
| U 65 | 65 " | ulfik | ulfok | uldif | |
| U 60 | 60 " | ulfik | ulfok | uldik | |
| U 40 | 40 " | ulfir | ulfor | uldir | |

Ultra-Cella-filters of every degree of perviousness

| | | | | |
|--------|----------------|-------|-------|----------------------------------|
| UC 300 | 300 mm | ulcid | ulcod | gauged tested on albumen density |
| UC 150 | 150 " | ulcim | ulcom | ulrim |
| UC 90 | 90 " | ulcin | ulcon | ulrin |
| UC 75 | 75 " | ulcis | ulcos | ulris |
| UC 65 | 65 " | ulcif | ulcof | ulrif |
| UC 60 | 60 " | ulcik | ulcok | ulrid |
| UC 40 | 40 " | ulcir | ulcor | ulrir |

Filters with fixed time of transit (Z-Values) have 10% advance of cost.

Keeping- and packing boxes.

Copper boxes with covers:

| Nr. | Size | Code-W. | Nr. | Size | Code-W. |
|--------|-------------------------|---------|-------|------------------------|---------|
| Ku 500 | f. 500 mm filters | kudas | Ku 95 | f. 90 mm filters, high | kudah |
| Ku 300 | f. 300 mm filters | kudag | Ku 90 | f. 90 mm filters, low | kudak |
| Ku 155 | f. 150 mm filters, high | kudam | Ku 45 | f. 40 mm filters, high | kudal |
| Ku 150 | f. 150 mm filters, low | kudan | Ku 40 | f. 40 mm filters, low | kudar |

Aluminiumboxes: (with glass set, to be closed)

| | | | | | |
|-------|------------------------|-------|-------|------------------------|-------|
| Al 90 | for filters of 90 mm Ø | aldos | Al 75 | for filters of 75 mm Ø | aldon |
|-------|------------------------|-------|-------|------------------------|-------|

Membranfiltergesellschaft

Göttingen Sartorius-Werke Aktiengesellschaft & Co.
Weender Landstraße 96/98 - Telefon 2129 und 4788



I

**Über ein Verfahren des Nachweises von Colibakterien
und Angehörigen der Typhus-Paratyphusgruppe in Trink-
wasser mit Hilfe von Membranfiltern (M.-F.-Methode)**

II

**Über den Nachweis von Typhus-Paratyphusbakterien in
Oberflächenwasser mit Hilfe der Membranfilter - (M.-F.-)
methode, zugleich ein Beitrag zur Frage der Leistungs-
fähigkeit der Wismutsulfitagarplatte nach Wilson und Blair**

von

Prof. Dr. H. Großmann und Dr. A. Beling

Arbeiten, im Jahre 1944 an einem hygienischen Universitätsinstitut ausgeführt

Membranfiltergesellschaft

Göttingen Sartorius-Werke Aktiengesellschaft & Co.

Weender Landstraße 96 98 - Telefon 2129 und 4788



I

Über ein Verfahren des Nachweises von Colibakterien und Angehörigen der Typhus-Paratyphusgruppe in Trinkwasser mit Hilfe von Membranfiltern (M.-F.-Methode)

II

Über den Nachweis von Typhus-Paratyphusbakterien in Oberflächenwasser mit Hilfe der Membranfilter- (M.-F.-) methode, zugleich ein Beitrag zur Frage der Leistungsfähigkeit der Wismutsulfitagarplatte nach Wilson und Blair

VON

Prof. Dr. H. Großmann und Dr. A. Beling

Arbeiten, im Jahre 1944 an einem hygienischen Universitätsinstitut ausgeführt

Als Manuskript gedruckt

Große-Druck CFA 607, 7978, 2000, 3. 46. Kl. B

I

Über ein Verfahren des Nachweises von Colibakterien und Angehörigen der Typhus-Paratyphusgruppe in Trink- wasser mit Hilfe von Membranfiltern (M.-F.-Methode)

von

Prof. Dr. H. Großmann und Dr. A. Beling

Arbeiten, im Jahre 1944 an einem hygienischen Universitätsinstitut ausgeführt

Die Membranfilter nach Zsigmondy kommen ebenso wie andere Bakterienfilter in erster Linie dann zur Anwendung, wenn es sich um die Entkeimung von Flüssigkeiten handelt. Auch in der Virus- und Bakteriophagenforschung finden diese Filter wegen ihrer guten Brauchbarkeit mehr und mehr Eingang (vgl. G. Seiffert). Gegenüber den Hartfiltern haben sie den Vorteil, daß durch Absorption eine Veränderung der Zusammensetzung der Flüssigkeiten bzw. Lösungen nicht eintritt. Im Jahre 1932 haben erstmals russische Autoren (Barsow, Dianowa, Woroschilowa, Rasumof) unter ganz neuen Gesichtspunkten diese Filter für bakteriologisch-diagnostische Zwecke angewandt. Das Interesse richteten sie nicht, wie gewöhnlich, auf das Filtrat, sondern auf den Filtrerrückstand. Die auf der Oberfläche des Filters angereicherten Keime werden in Koloniewachstum gezüchtet, gezählt und diagnostiziert, indem das Filter auf einen festen Nährboden gelegt und dieses wie üblich bebrütet wird.

Das Verfahren wurde zunächst bei Trink- und Gebrauchswässern für den Colinachweis ausgearbeitet und weiterhin auch auf andere keimhaltige Flüssigkeiten, wie Obstsaft, Brausen, Biere usw. ausgedehnt, und wurde im Jahre 1943 in Deutschland bekanntgemacht. Eine erste kurze Mitteilung hierüber erschien in Deutschland von Schütz und Kruse im Jahre 1943.

Apparatur und Methode

Die erforderliche Apparatur (vgl. Abb. 1) und die Filter werden von der Membranfilter-Gesellschaft Sartorius-Werke, Göttingen, geliefert. Die für die laufende Untersuchung von Wasser am meisten geeignete Apparatur besteht aus folgenden Hauptteilen:

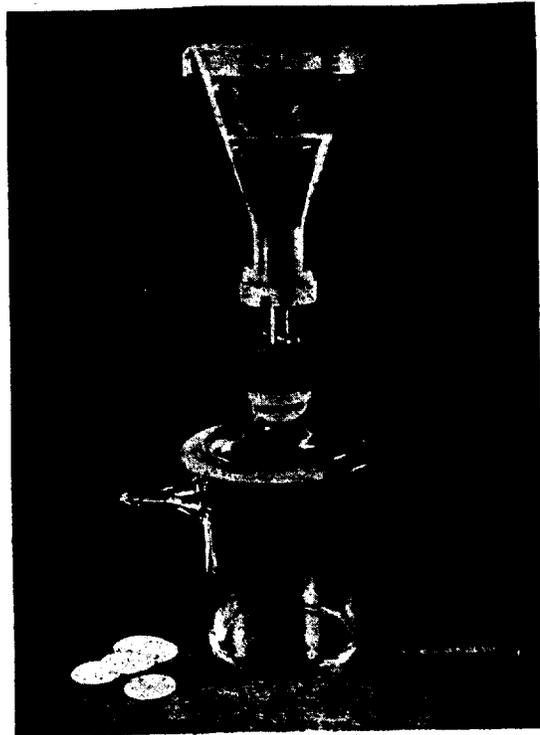


Abb. 1

1. Graduierter Glastrichter mit Glasdeckel und einem unteren mit Bajonettverschluß versehenen Metallteil,
2. einem Metallaufsatzstück mit Bajonettverschluß und Filterplatte zum Auflegen der Membranfilter,
3. Wittscher'topf oder Saugflasche mit Gummistopfen.
4. Saugpumpe (Wasserstrahl oder elektrisch).

Die Größe dieser Teile ist bemessen für eine Membranfiltergröße von 42 mm \varnothing . Jedes Filter ist numeriert. Diese Nummer bezeichnet die Porengröße. Die Dicke der Filter beträgt ca. 0,1 mm. Aus Tabelle 1 ist die Beziehung der Porengröße zur Filtergeschwindigkeit bei Verwendung von aqua dest. und einem Saugdruck von 0,5 Atmo-

sphären ersichtlich. Für die Untersuchung von Trink- und Gebrauchswässern sind die Nummern 5 und 6 am geeignetsten.

Tabelle 1

| Nr. des Filters | Durchschnittliche Dauer der Filtration von 500 ccm aqua dest. | Kürzeste und längste Dauer der Filtration | Größe der Poren in μ |
|-----------------|---|---|--------------------------|
| 10 | 5,0' | 4-6' | 0,35 |
| 6 | 4,0' | 3-5' | 0,5 |
| 5 | 2,25' | 1,5-3' | 0,7 |
| 2 | 70" | 45-90" | 0,9 |
| 1 | 35" | 25-45" | 1,2 |

Die Benutzung von Filtern größeren Durchmessers macht einen entsprechend größeren aus Porzellan hergestellten Apparat erforderlich. Der Filterapparat aus Porzellan für größere Membranfilter ist dann angezeigt, wenn ein sehr hoher Keimgehalt der Wasserprobe angenommen werden muß. Die Kolonien verteilen sich dann auf eine größere Filterfläche, sodaß auch bei relativ großen Mengen das Wachstum von Einzelkolonien zu erwarten ist.

Die Filter werden von der Firma in trockenem Zustand versandt. Vor der Verwendung für bakteriologische Zwecke ist zu empfehlen, sie in 20%-igem Alkohol aufzubewahren. Sie werden gebrauchsfähig gemacht, indem sie 2 bis 3 mal je 20 Minuten in destilliertem Wasser gekocht, damit sterilisiert werden. Dadurch wird zugleich die in den Poren enthaltene Luft entfernt. Die Poren werden frei passierbar für die Nährstoffe des Spezial-Endoagars (s. u.), die durch Kapillarkwirkung die Oberfläche des Filters benetzen.

Bereits vor der Vorbereitung der Filter war der Apparat mit 90 %-igem Alkohol in folgender Weise sterilisiert worden:

Man umwickelt einen Glas- oder Metallstab mit Watte, taucht ihn in den Alkohol, entzündet ihn und brennt damit die Innenseite des Glasrichters, dessen unteren Metallteil, den Deckel und den Aufsatzzwischenstück mit Glasfilter gut ab. Beim Abbrennen des Zwischenstücks muß zugleich mittels der Saugpumpe Luft durch das Glasfilter gesaugt werden, damit auch dieses sicher sterilisiert wird. Dem „zünftigen“ Bakteriologen mag diese Art der Sterilisation zunächst nicht kunstgerecht vorkommen, eingehende Erfahrung und eigens angestellte Kontrollen haben uns jedoch gezeigt, daß diese Art

der Behandlung für diesen Zweck einwandfrei und genügend ist, wenn das Abbrennen nur gewissenhaft durchgeführt wird. Man hat also die Möglichkeit, mehrere aufeinanderfolgende Untersuchungen mit dem gleichen Apparat durchzuführen, während bei Sterilisation im Dampf das Verfahren mit größeren und zeitraubenden Umständen verbunden wäre.

Weiterhin gestaltet sich der Untersuchungsvorgang wie folgt:

Das Filter wird mit einer Pinzette steril entnommen und auf die Filterplatte so aufgelegt, daß die die Nummer tragende Seite nach oben zu liegen kommt. Durch Ingangsetzen der Saugpumpe und vorsichtiges Öffnen des seitlich am Mittelstück angebrachten Hahnes wird das Filter an der Unterlage leicht angesaugt. Dann wird der Trichter auf das Mittelstück aufgesetzt und durch Drehen des Verschlusses befestigt. Vor der Filtration bleibt der Hahn am Mittelstück geschlossen. Die zur Untersuchung benötigte Wassermenge wird in den Trichter eingegossen, sie kann 10,0 bis 500 ccm betragen. Wir verfahren dabei im allgemeinen so, daß wir bei zentralen Versorgungsanlagen, die Grundwasser bzw. filtrierte Oberflächenwasser fördern, 250 bis 300 ccm Leitungswasser, bei Rohrbrunnen 10,0 bis 100 ccm, bei mehr oder weniger flachen Schachtbrunnen 10,0 und 50 oder 100 ccm zugleich verwenden. Es empfiehlt sich die Untersuchung auch kleinerer Mengen schon deshalb, weil bei flacheren Brunnen mit größerem Keimgehalt auch mit einer größeren Zahl von Coli-Keimen gerechnet werden muß. Einen Anhaltspunkt für die voraussichtlich notwendigen und geeigneten Wassermengen geben uns in der Regel die verschiedenen Hinweise, die in den von uns ausgegebenen Fragebogen über die örtlich hygienischen Verhältnisse enthalten sind. Muß mit einer starken oder sehr starken Verunreinigung des Wassers gerechnet werden, dann hat man 1,0 ccm oder noch weniger zu filtrieren. Hierfür werden 10—20 ccm sterilen Wassers mit dem zu untersuchenden im Trichter gemischt. Es wird nun zur Filtration, nachdem die Pumpe in Gang gesetzt worden ist, der Hahn am Mittelstück geöffnet. Nach beendeter Filtration, die nicht bei zu hohem Saugdruck geschehen soll, damit unerwünschte Zufälle, wie z. B. das Zerreißen des Filters, vermieden werden, wird der Trichter abgenommen, das Filter unter sterilen Kautelen abgehoben, die untere Seite über der Flamme vorsichtig getrocknet und mit der die Nummer tragenden Seite nach oben auf die Spezialendplatte so gelegt, daß keine Luftblasen sich unter dem Filter bilden. Eine Platte von 10 cm Durchmesser kann mit 5 Filtern belegt werden. Die Platten werden für 16 bis 18 Stunden bei 37° bebrütet, wobei darauf zu achten ist, daß die Deckel nach unten zu liegen kommen. Nach

dieser Zeit werden die Kolonien gezählt, die einen deutlichen Metallglanz aufweisen. Die Zahl dieser Metallkolonien (M-Kolonien) wird der Zahl der im Wasser vorhandenen Colikeime gleichgesetzt. Hieraus errechnet sich dann der Colititer z. B. wie folgt: Es wurden 250 ccm Wasser filtriert, das Filter zeigt 5 M-Kolonien; danach beträgt der Colititer $250 : 5 = 50$ (vgl. Abb. 2).

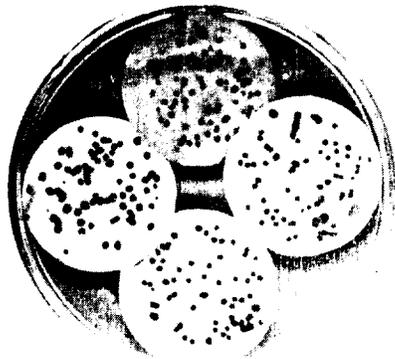


Abb. 2

Wenn das Filter mit einer sehr großen Zahl von M-Kolonien bewachsen ist, sodaß diese nur schwer zu zählen sind, dann errechnet man die Zahl der Colikeime, indem man einen Sektor auszählt und entsprechend vervielfältigt. Typische M-Kolonien erzeugen auf der Unterseite des Filters einen roten Fleck. Durch Zählen dieser Flecken kann die Colizahlbestimmung u. U. erleichtert werden. Wenn ein typischer Metallglanz nicht festzustellen ist, die Kolonien aber ihrem Aussehen nach Colikolonien sehr ähnlich sind, so ist es notwendig, solche Keime näher zu differenzieren (bunte Reihe), um evtl. dennoch als typische Colikeime angesprochen zu werden. Nach Beendigung der erwähnten Untersuchungen wird das Filter im Trockenschrank bei 60° über $1\frac{1}{2}$ Stunde getrocknet und kann aufbewahrt, evtl. in ein Tagebuch eingeklebt werden.

Natürlich kommen auch andere Keime als Colibakterien auf dem Filter zum Wachstum, wenn diese im Wasser enthalten waren, z. B. Sporenbildner oder Streptokokken, die ebenfalls aus Milchzucker Säure zu bilden vermögen und daher ebenso wie Colibakterien in roten Kolonien wachsen, manchmal auch mit Metallglanz. Sporenbildner können o. w. makroskopisch ausgeschaltet werden, Streptokokken in der Regel ebenfalls, da sie nach dem gesamten Koloniebild von Colibakterien im allgemeinen unschwer zu unterscheiden sind. Im Zweifelsfall entscheidet das Gram-Präparat. Selbstverständlich gestattet der Nährboden auch das Wachstum von pathogenen Darmbakterien, die gelegentlich im Wasser vorkommen können; in erster Linie interessieren dabei Keime der Typhus-Paratyphusgruppe. Treten verdächtige Kolonien dieser Art auf, so gestaltet sich die weitere Diagnose wie üblich. Mit dem Nachweis von Typhus-Paratyphusbakterien im Trinkwasser kann durch die Membranfilter-Methode in höherem Maße gerechnet werden als durch andere Verfahren, da die Methode die Verwendung von großen Wassermengen gestattet, und die Wahrscheinlichkeit der Erfassung auch von pathogenen Keimen damit steigt.

Die Erfahrungen haben frühzeitig gelehrt, daß der bei dem Verfahren anzuwendende Endoagar gegenüber dem originalen Nährboden modifiziert werden muß. Es wird ein Nährboden verwandt, der folgendermaßen hergestellt werden muß:

Auf je 100 ccm Fleischwasserpeptonagar (Agar 1%ig, pH 7,6) nimmt man 1 g Laktose, 0,13 g Natriumsulfit, 2,5 ccm einer 2%-igen alkoholischen Fuchsinlösung (basisch). Man kocht 1 g Milchzucker im Reagenzglas mit 5 bis 7 ccm aqua dest., kühlt ab und gibt das Natriumsulfit und die Fuchsinlösung hinzu. Das Gemisch gießt man in 100 ccm flüssigen Agar und gießt in 5 Petrischalen mit 10 cm \varnothing oder 3 Petrischalen mit 12 cm \varnothing aus. Die Endoplatten sollen im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch nicht getrocknet werden.

Eigene Untersuchungen

1. Kontrolle des Filtermaterials.
2. Über die Differenzierung der „typischen“ und „atypischen“ Coli-keime durch Membranfilter.
3. Vergleichende Untersuchungen mit dem Verfahren nach Eijkman.
4. Über den Einfluß der Bebrütungsdauer auf die Ermittlung der Colizahl.
5. Ergebnisse an rund 2000 Untersuchungen im Rahmen der Aufgaben der Trinkwasserhygiene.

ad 1) Voraussetzung für ein sicheres Arbeiten ist die Zuverlässigkeit des Filtermaterials. Es war daher zuerst ein Versuch zur Kontrolle von Filtern verschiedener Herstellungsnummern notwendig. An 50 Filtern der Nummern 5, 6 und 10 wurde die Durchlässigkeit geprüft, indem künstlich mit Colibakterien stark verunreinigtes Wasser filtriert und das Filtrat auf Sterilität geprüft wurde. Unter diesen 50 Filtrationen kam es einmal bei Verwendung eines Filters Nr. 5 vor, daß das Filtrat nicht steril war, sondern Colibakterien enthielt. Bei den anderen 49 Untersuchungen blieb das Filtrat auch bei längerer Bebrütungsdauer steril. Die Ursache des einen Versagers kann darauf beruhen, daß das Filter einen makroskopisch nicht feststellbaren Fehler aufwies, oder daß es nicht richtig auf die Unterlage gelegt worden war. Es ist nämlich besonders darauf zu achten, daß das Filter gut angesaugt wird (s. o.) und sein Rand genau auf den Rand des Trichtergefäßes zu liegen kommt. Wird diese Vorsicht nicht gewissenhaft eingehalten, dann kann es vorkommen, daß das Wasser zum Teil unter dem Filter durchgesaugt wird. Die zweite Fehlerquelle kann sicher vermieden werden, die erste jedoch nicht. Wenn auch gerade bei den Membranfiltern nach Zsigmondy die Gleichmäßigkeit der Porengröße besonders gerühmt wird, so ist eine gelegentliche Unregelmäßigkeit der Herstellung doch nicht sicher auszuschließen. Es muß also damit gerechnet werden, daß in ganz seltenen Fällen bei einer Filtration die tatsächliche Colizahl nicht ermittelt werden kann, da das Filter Poren besitzt, die über die angegebene Größe hinausgehen. Aber es ist auch der andere Fall zu erwägen, daß trotz einwandfreien Filters kleinste Formen von Bakterien das Filter passieren. Sicher muß auch hiermit gerechnet werden, denn es kann heute wohl nicht mehr bezweifelt werden, daß es „filtrierbare“ Bakterienformen gibt. Dieser Zufall könnte die grundsätzliche Brauchbarkeit der Membranfilter wohl ebenso wenig ernstlich beeinträchtigen wie der gelegentliche und unbemerkte Anfall eines defekten oder durchlässigen Filters.

Aus diesem Kontrollversuch geht also hervor, daß das Filtermaterial im ganzen eine sehr gute Sicherheit gewährleistet.

ad 2) Der Metallglanz der Kolonien auf Endoagar wird allgemein als ein hauptsächliches Kennzeichen unter mehreren anderen für die Colidifferenzierung angesehen. Der o. a. Endoagar fördert die Fuchsin-speicherung und damit die Ausbildung von M-Kolonien, so daß „echte“ Colibakterien an diesem ins Auge fallenden Merkmal in erster Linie zu erkennen sind, sofern das Koloniebild auch sonst dem von Colibakterien entspricht, von diesem jedenfalls nicht sichtlich abweicht. Es mußte daher festgestellt werden, inwieweit der Metallglanz dem

Verhalten von sogenannten typischen Colikeimen gemäß der bunten Reihe entspricht, bzw. ob das Fehlen eines deutlichen Fuchsinglanzes „typische“ Colikeime ausschließt oder nicht. Die bunte Reihe erstreckte sich auf die Zersetzung von Traubenzucker und Milchzucker, die Spaltung von Rohrzucker und die Indolbildung. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, wurden 200 M-Kolonien und 65 rote Kolonien ohne Metallglanz geprüft.

Tabelle 2

| Colibakterien | Zahl der Stämme mit Metallglanz auf Endoagar | Zahl der Stämme ohne Metallglanz auf Endoagar |
|---------------|--|---|
| typisch | 185 | 5 |
| atypisch | 15 | 60 |
| Sa. | 200 | 65 |

In weitaus der Mehrzahl der Fälle entsprach dem bekannten Colikoloniebild das Ergebnis einer bunten Reihe, wie es wohl allgemein heute gefordert wird: Vergärung von Traubenzucker und Milchzucker unter Gasbildung und vorhandene Indolbildung. In einigen Fällen konnte die Säuerung von Saccharose die Diagnose „typisch“ in Anbetracht der sonstigen eindeutig positiv vorliegenden Merkmale nicht ausschließen. Aber es fanden sich auch einige Kolonien, bei denen ein Parallelismus zwischen Koloniebild und bunter Reihe nicht bestand. Hier müssen wir also die Konzession machen, daß bei Beurteilung nach positivem Fuchsinglanz allein einige Stämme erfaßt und diagnostiziert werden, die in Wahrheit nicht als „typisch“ zu gelten haben. Umgekehrt fallen einige Stämme ohne Glanz aus, obwohl sie vielleicht richtiger, wenn man die bunte Reihe heranzieht, als „typisch“ zu beurteilen wären. In den letzteren Fällen wird ohnehin die bunte Reihe, wie schon oben angegeben, die Diagnose sichern. Nun ist bekanntlich in der Wasserhygiene die Colidifferenzierung heute noch der Schwierigkeit unterworfen, daß die Abgrenzung „typisch“ von „atypisch“ mit Sicherheit nicht immer möglich ist. Wir können dabei allerdings nicht soweit gehen, wie H. Bruns, der offenbar der Ansicht ist, daß ein Stamm, der Saccharose zersetzt, sich vom „typischen“ Coli soweit entfernt, daß er nicht zu berücksichtigen sei. Diese mißliche Lage ergibt sich wohl aus der erheblichen Variabilitätsbreite der Coligruppe und kein bisheriges Differenzierungsverfahren wird dem soweit gerecht, daß es gänzlich ohne die subjektive Einstellung des mehr oder weniger erfahrenen Untersuchers abginge. Wenn man sich aber schon auf ein

bestimmtes Verfahren festlegen muß, so glauben wir in der vorliegenden Frage mit der M.-F.-Methode Erfahrungen gemacht zu haben, die sowohl den theoretischen wie den praktischen Forderungen weitestgehend entsprechen. Der damit verbundene Nachteil, daß gelegentlich ein glänzender Stamm als „bedenklich“ bezeichnet wird, der nicht zum „echten“ Coli gehört, beeinträchtigt keinesfalls ernstlich die Vorteile des Verfahrens. Wenn man einräumt, daß bei jeder Methode gewisse Nachteile hinzunehmen sind, so können die Vorteile der M.-F.-Methode gegenüber dem am meisten verbreiteten Verfahren nach Eijkman nicht bezweifelt werden. Dies ist aus der nächsten Versuchsreihe deutlich ersichtlich. Davon abgesehen ist in der Wasserhygiene ein strenges Schema nicht angezeigt, vielmehr hat die besondere Lage des einzelnen Falles zu der Entscheidung mit beizutragen, ob einem Befund eine Bedeutung beizumessen ist oder nicht.

ad 3) 200 Wasserproben, und zwar 140 Proben Leitungswasser und 60 Proben Brunnenwasser, wurden zugleich nach Eijkman und mit der M.-F.-Methode untersucht. Für die Filtration haben wir bei Wasser aus Einzelbrunnen 10—50 ccm, bei zentralen Versorgungsanlagen 100—250 ccm Wasser verwandt. Nach Eijkman wurden bei Brunnenwasser angesetzt 0,1, 0,5, 1,0, 10,0 und 25,0 ccm, bei Leitungswasser 0,1, 0,5, 10,0 und 100,0 ccm.

Tabelle 5

| Herkunft der Proben | Gesamtzahl der Untersuchungen | Zahl der nach Eijkman positiven | Zahl der mit Membranfilter positiven | mit beiden Verfahren übereinstimmend |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Einzelbrunnen | 60 | 24 | 30 | 54 |
| Zentrale Versorgungsanlagen | 140 | 18 | 32 | 126 |
| Sa. | 200 | 42 | 62 | 180 |

Aus der Tabelle 3 sind die Ergebnisse vergleichsweise ersichtlich: Mit der M.-F.-Methode wurden wesentlich mehr positive Fälle festgestellt, besonders bei der Untersuchung von Leitungswässern. Nur in einem einzigen Falle war Eijkman positiv, die M.-F.-Methode negativ. Es kann als sicher angenommen werden, daß sich dieses viel bessere Abschneiden der Leitungswässer hauptsächlich aus der Verwendung größerer Wassermengen zur Untersuchung erklärt als dies bei

dem Eijkman'schen Verfahren durchführbar ist, wenn dieses im großen angewandt wird. Auch bei den Proben aus Einzelbrunnen dürfte dies ins Gewicht fallen, denn auch hier wurden im ganzen große Wassermengen untersucht. Es muß erwähnt werden, daß die Eijkmankolben aus äußeren Gründen nicht bei 46°, sondern nur bei 37° bebrütet werden konnten. Es kann sich dies für Eijkman zum Nachteil ausgewirkt haben. Andererseits ist es bekannt, daß die Bebrütung bei 46° gegenüber der nur bei 37° nicht immer mit dem ursprünglich angenommenen großen Vorteil des Verfahrens verbunden ist. Tatsächlich verzichten viele Laboratorien überhaupt auf eine Bebrütung bei 46°. Umgekehrt ist auch hervorzuheben, daß wir in der Regel nicht nur die Kolben bzw. Röhren mit Gasbildung zur weiteren Untersuchung abgeimpft haben, sondern alle Kulturen, die Wachstum zeigten. Dadurch wurde sicher mancher Colistamm erfaßt, der dem Eijkman'schen Grundprinzip nicht als solcher entsprach und „normalerweise“ nicht erkannt worden wäre. Dieses Verfahren kam also der Eijkman'schen Methode zugute. Wägt man Vor- und Nachteile ab, so kommt man zu dem Ergebnis: Die M.-F.-Methode hat den großen Vorteil, daß beliebig große Wassermengen untersucht werden können, und daß die Schwierigkeiten, die aus dem gleichzeitigen Vorhandensein von Saprophyten aller Art für den Colinachweis bei Eijkman erwachsen, wegfallen.

ad 4) Die Erröchnerung des Colititers stützt sich auf die Menge der auf dem Filter gewachsenen und gezählten Kolonien. Dabei wird stillschweigend von der Annahme ausgegangen, daß jede Kolonie einem Colikeim entspricht. Diese Annahme ist nicht ohne weiteres richtig, da wir ja nicht ein Reinkulturverfahren im Koch'schen Sinn anwenden. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß die gezählten Kolonien hinter der Menge der tatsächlich vorhandenen Colikeime mehr oder weniger zurückbleiben. Bei dichterem Wachstum und bei längerer Bebrütung könnten manche Kolonien so zusammenwachsen, daß auch mit der Lupe nur eine Kolonie abgelesen wird statt mehrerer. Um nach Möglichkeit die Größe dieser Fehlerquelle, sofern sie überhaupt vorliegt, zu ermitteln, wurden folgende sieben Versuche angesetzt (s. Tabelle 4). Colifreie Wässer wurden mit einer verdünnten Aufschwemmung von Colibakterien versetzt. Die gleiche Menge Wasser wurde mehrere mal hintereinander filtriert und die bebrüteten Filter wurden nach 8, 10, 14, 16 und 24 Stunden durch Auszählen der Kolonien untersucht. Aus Tabelle 4 ist folgendes ersichtlich: Die Menge der gezählten Kolonien nimmt mit der Dauer der Bebrütung ab. Diese Abnahme ist bis zu 16 Stunden gegenüber der Zahl nach 8 Stunden in der Regel nicht

Tabelle 4

| Versuch Nr. | Bebrütungsdauer in Stunden | | | | |
|----------------|----------------------------|----|----|----|----|
| | 8 | 10 | 14 | 16 | 24 |
| I | 25 | 25 | 20 | 20 | 19 |
| II | 29 | 29 | 29 | 27 | 16 |
| III | 26 | 20 | 19 | 19 | 18 |
| IV | 25 | 25 | 23 | 17 | 17 |
| V | 33 | 33 | 27 | 27 | 28 |
| VI | 30 | 30 | 27 | 25 | 25 |
| VII | 25 | 25 | 24 | 25 | 20 |

erheblich, nach 24 Stunden kann sie aber schon wesentlich größer sein. So ist bei Versuch II die Kolonienzahl nach 24 Stunden gegenüber der nach 8 Stunden fast um die Hälfte abgesunken, während nach 16 Stunden kaum ein Rückgang festzustellen war. Diese Erscheinung beruht, wie vermutet und wie es sich durch fortlaufendes Auszählen auch feststellen läßt, auf dem Zusammenwachsen mehrerer Kolonien, sodaß bei zunehmender Bebrütungsdauer weniger Kolonien gezählt werden als ursprünglich angewachsen sind. Das Absinken bis 16—18 Stunden muß also in Kauf genommen werden, denn erst nach dieser Zeit sind die Kolonien so groß ausgewachsen und ist der Metallglanz so gut entwickelt, daß leicht gezählt und diagnostiziert werden kann. Erst nach 24 Stunden zu zählen, ist nicht nötig und auch nicht ratsam, da die Zahlen von den ursprünglichen schon stark abweichen können. Das ist besonders zu beachten, wenn es sich um stark verunreinigte Wässer handelt. Diese Fehlerquelle ist nicht zu bestreiten, aber doch nicht von erheblicher Bedeutung. Es braucht nicht betont zu werden, daß die Genauigkeit der Colititermittlung trotzdem viel höher liegt als bei dem Verfahren nach Eijkm an (s. o.).

ad 5) Auf Grund der oben geschilderten Versuche haben wir die M.-F.-Methode für die laufenden Wasseruntersuchungen eingeführt und an rund 2000 Proben die in Tabelle 5 wiedergegebenen Befunde erhoben. Diese beziehen sich auch auf den Nachweis von Keimen der Typhus-Paratyphusgruppe.

Tabelle 5

| Herkunft der Proben | Gesamtzahl d. Untersuchung | Positive Befunde für | | | | | | | | für Typhus-Paratyphusgruppe positive Befunde insgesamt | |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|------|-------------|------|-----------------------------|------|-------------------|------|--|------|
| | | Bact. Coli | | Bact. typhi | | Bact. typhi und Paratyphi B | | Bact. Paratyphi B | | Zahl | ‰ |
| | | Zahl | ‰ | Zahl | ‰ | Zahl | ‰ | Zahl | ‰ | | |
| Wasserwerk | 1465 | 182 | 12,3 | — | — | — | — | 2 | 0,13 | 2 | 0,13 |
| Zentrale Anlagen in Kleinstädten | 115 | 32 | 28,0 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Einzelne Rohrbrunnen | 130 | 41 | 31,5 | 2 | 1,6 | 1 | 0,7 | 1 | 0,7 | 4 | 3,0 |
| Einzelne Schachtbrunnen | 235 | 185 | 78,7 | 3 | 1,3 | — | — | 2 | 0,8 | 5 | 2,1 |
| Sa. | 1945 | 440 | 22,5 | 5 | 0,25 | 1 | 0,04 | 5 | 0,25 | 11 | 0,54 |

Die Mehrzahl dieser letzteren Befunde wurde nicht mit dem o. a. Endoagar, sondern mit einem für unsere besonderen Zwecke etwas abgeänderten Wismutsulfitagar nach Wilson und Blair erhoben. Dieser für das Wachstum, besonders von Typhuskeimen, aber auch für das von Paratyphusbakterien elektive Nährboden hat sich nicht nur für die Diagnose aus Stuhl und Urin, sondern vor allem auch für den Nachweis dieser Bakterien in Wasser und Abwasser durch die M.-F.-Methode sehr gut bewährt. Auf diese Befunde kommen wir in der Mitteilung II zurück, hier soll nur darauf hingewiesen werden, daß die M.-F.-Methode sehr wohl auch zu dem sehr wichtigen Nachweis pathogener Keime herangezogen und ausgebaut werden kann.

Sehr häufig wurden Colibakterien in den Schachtbrunnen nachgewiesen, mit abfallender Häufigkeit in Einzelrohrbrunnen und im Leitungswasser zentraler Versorgungsanlagen. Dem entspricht die Feststellung, daß die hygienischen Verhältnisse bei Schachtbrunnen erfahrungsgemäß und in unserem Untersuchungsgebiet ganz besonders eindeutig am ungünstigsten liegen, dagegen besser, aber doch auch unbefriedigend bei Einzelrohrbrunnen. Häufig handelt es sich auch hier, wie bei den Schachtbrunnen, um flache Anlagen, die Verunreinigungen von oben leicht ausgesetzt sind. Dementsprechend ergaben diese beiden Brunnenarten auch am häufigsten einen positiven Typhus- oder Paratyphusbefund. Auch aus Wasserproben von kleineren zentralen Anlagen der ländlichen Kreise wurden recht oft Colibakterien gezüchtet. Zum Teil

liegen hier tatsächlich Verunreinigungen des Grundwassers bzw. Leitungswassers vor, zum Teil beruhen die Befunde sicher auf zufälligen Verunreinigungen; dies wird auch dadurch wahrscheinlich gemacht, daß das von uns laufend selbst überwachte Werk einer Großstadt wesentlich seltener Colibakterien aufwies. Wenn aber auch hier die Colibefunde doch häufiger sind, als man bei einer zentralen Großanlage, die boden- und uferfiltriertes Flußwasser fördert, erwarten sollte, so erklärt sich dies aus besonderen örtlichen Verhältnissen. Aus den gleichen Zusammenhängen erklärt es sich wohl, daß gerade hier mit der M.-F.-Methode Paratyphus-B-Bakterien wiederholt nachgewiesen wurden.

Zusammenfassende Beurteilung.

Die Anforderungen, die im allgemeinen an ein neues Verfahren gestellt werden müssen, sind: Sicherheit, Einfachheit und Schnelligkeit. Nur wenn diese Voraussetzungen wirklich gegeben sind, besteht die Aussicht, daß sich eine neue Methode mehr und mehr einführt. Dies bedeutet nicht, daß etwas Neues nur mit Vorteilen verbunden sein müsse und nicht auch Nachteile aufweisen könne, gegenüber bereits bewährten Methoden müssen aber die Vorteile überwiegen. Auf Sicherheit und Schnelligkeit der bakteriologischen Untersuchung muß auch die Trinkwasserhygiene besonderen Wert legen, da ihr im Rahmen der Seuchenbekämpfung eine bedeutsame Stellung zukommt. Der Colititer hat sich als Indikator für die hygienische Beurteilung seit langem bewährt. Zwar gehen die Ansichten über seine Bewertung im einzelnen auseinander, und es lassen sich Gründe für und gegen seine hervorragende Bedeutung anführen. Es möchte aber kein Hygieniker in seiner verantwortungsvollen Tätigkeit auf die Coliuntersuchung verzichten. Das Bestreben muß dahingehend gerichtet sein, Colibefunde im Wasser möglichst sicher und genau zu erfassen und nicht zu übersehen. Daß dies bei der Verwendung von größeren Wassermengen eher möglich ist als bei der von kleineren, ist außer Zweifel. Diesen Vorteil bietet die M.-F.-Methode mehr als jede andere, er kommt vor allen Dingen der laufenden Untersuchung von zentralen Versorgungsanlagen zugute. Daß der Colititer auf diese Weise ebenfalls genauer erfaßt wird als mit allen anderen Methoden, ergibt sich ohne weiteres aus der Möglichkeit, eine recht genaue Colikeimzählung vorzunehmen. Die Colikeime werden bekanntlich auch bei dem Göttinger Verdunstungsverfahren nach Marmann und mit der Milchzuckerfuchsin-

gelatine nach Bürger gezählt, doch fallen auch hierfür, wie gesagt, beliebig große Wassermengen weg, außerdem sind auch diese Verfahren zeitraubender, umständlicher und kostspieliger als die M.-F.-Methode. Die Abgrenzung der „echten“ Colibakterien stützt sich beim M.-F.-Verfahren in erster Linie auf das Koloniebild, wobei der Metallglanz als Merkmal gegenüber den „nicht echten“ Colibakterien besonders betont wird. Wie oben gezeigt, stimmt dieses „Schnellverfahren“ überraschend gut mit der biochemischen Differenzierung überein. In manchen Fällen werden dadurch zeitraubende, mit Schwierigkeiten verbundene Untersuchungsreihen vermieden, die schließlich dennoch nicht zu einer eindeutigen Abgrenzung führen. Es wird immer eine gewisse Zahl von zweifelhaften Fällen geben, bei denen es dem Untersucher überlassen bleiben muß, sich je nach Lage der örtlichen Umstände und sonstiger Bekundungen nach der negativen oder positiven Seite zu entscheiden. Man kann also nicht sagen, daß diese einfache Handhabung einer Ungenauigkeit in der Differenzierung entspreche. Endlich ist auch nicht zu vergessen, daß bei der M.-F.-Methode die Möglichkeit der beschleunigten Durchführung von wiederholten und kontrollierenden Untersuchungen als weiterer Sicherheitsfaktor gegeben ist. Hierin stehen die anderen Verfahren erheblich zurück.

Eines weiteren Punktes, der die Frage der Sicherheit betrifft, muß noch Erwähnung getan werden. In unsere oben mitgeteilten Untersuchungen haben wir ohne Auswahl Wasserproben jeder Art und Herkunft einbezogen. Darunter befanden sich auch, besonders bei den Einzelbrunnen, solche Proben, die erst nach mehrtägigem Transport zur Untersuchung kamen. Es ergibt sich die Frage, ob eine längere Transportdauer nicht ungünstig auf den Colinachweis mittels Membranfiltern wirkt. Zweifellos finden sich in solchen Proben auch Colibakterien, die in ihrer Vitalität stark geschwächt sind. Sie könnten auf der Endplatte, von deren Oberfläche aus die Nährstoffe durch die engen Filterporen diffundieren, nicht mehr ankommen, wohl aber im flüssigen Nährboden. Zwar haben wir hierzu eigens Untersuchungen nicht angestellt, doch sprechen die in den Tabellen 2—5 niedergelegten Ergebnisse gegen eine solche Möglichkeit. Der vermehrte Colinachweis gegenüber Eijkman und die sehr häufigen Colibefunde gerade in Proben aus Schachtbrunnen berechtigen uns vielmehr zu der Annahme, daß dieser Frage eine praktische Bedeutung im Sinne einer Fehlerquelle kaum zuzukommen scheint. Soweit es sich bei hoher Gesamtkeimzahl um wenig Colikeime handelt, dürfte im allgemeinen der Vorteil gerade auf Seiten der M.-F.-Methode, also des festen Nährbodens liegen, da hier antagonistische Wirkungen, die im flüssigen Nährboden

die Vermehrung geschwächter Colikeime nicht gestatten, nicht die gleiche Rolle spielen. Bei größeren Colimengen wird es wohl eher zu einem Ausgleich kommen. Man könnte fast annehmen, daß das Filter gerade besonders günstige Bedingungen für Oberflächenwachstum bietet, gegenüber festem Nährboden ohne Filter jedenfalls nicht zurücktritt. Besondere Untersuchungen hierzu stehen allerdings noch aus.

So kommen wir zu dem Schluß:

1. Die Membranfilter nach Zsigmondy eignen sich vorzüglich zum zahlenmäßigen Nachweis von Colibakterien und Keimen der Typhus-Paratyphusgruppe in Trinkwasser, indem die im Filtrerrückstand enthaltenen Keime durch Auflegen des Filters auf einen festen Spezialnährboden zur Vermehrung mit Koloniewachstum gebracht werden.

2. Gegenüber dem Anreicherungsverfahren nach Eijkman gelingt der Colinachweis wesentlich häufiger.

3. Der Hauptvorteil ist darin zu erblicken, daß bei nicht zu keimreichen Wässern beliebig große Wassermengen untersucht werden können. Dadurch werden geringe Colimengen leichter erfaßt, die Sicherheit des Nachweises wird also erhöht.

4. Als weitere Vorteile sind gegenüber allen derzeitigen Methoden festzustellen: Einfachheit, Schnelligkeit und Billigkeit ohne Beeinträchtigung der gebotenen Sicherheit in der Diagnose.

5. Als Nachteile sind zu vermerken: Die Abhängigkeit von Beschaffenheit und Beherrschung der Apparatur und von der Qualität des Filtermaterials. Die Erfahrung zeigt, daß diese Nachteile gegenüber den Vorteilen praktisch nicht ins Gewicht fallen.

6. Die Methode wird zur weiteren Nachprüfung und zur Einführung in die Trinkwasserhygiene empfohlen.

Schrifttum.

1. *R. Barsof*, Microbiology. Vol. I p 4 (1932) (russisch).
2. Ders. *ibid.* Vol. II, 292 (1932) (russisch).
3. Ders. *ibid.* Vol. IV, 912 (1937) (russisch).
4. *H. Bruns*, Vom Wasser, XI, 84 (1936).
5. *N. Cholodny*, Zbl. Bakter. II Orig. 77, 179 (1929).
6. *Dianowa* und *Woroschilowa*, Microbiology. Vol. I p 3 (russisch).
7. *E. Eichhoff*, Zbl. Bakter. I Orig. 86 (1921).
8. *E. Manegold u. Hofmann*, K. Z. 50, 22 (1930).
9. *Membranfilter-Gesellschaft Göttingen*, „Eine neuartige Untersuchung von Wasser auf Coli-Bakterien“ (1943).
10. *H. Meyeringh*, Z. Hyg. 97, 116 (1922).
11. *Rasumof*, Microbiology. Vol. II, 346 (1933) (russisch).
12. *E. W. Schmidt*, Zbl. Bakter. II Orig. 58, 464 (1923).
13. *Schütz u. Kruse*, Klin. Wschr. 32, 520 (1943).
14. *G. Seiffert*, Virus u. Viruskrankeiten. Wissenschaftliche Forschungsberichte, Naturwissenschaftl. Reihe. Bd. 46, 23.
15. *R. Zsigmondy u. W. Bachmann*, Ztschr. anorg. Chemie 103, 119 (1918).
16. *R. Zsigmondy*, Z. Hyg. 102, 97 (1924).

II

Über den Nachweis von Typhus-Paratyphusbakterien in Oberflächenwasser mit Hilfe der Membranfilter-(M.-F.-)methode, zugleich ein Beitrag zur Frage der Leistungsfähigkeit der Wismutsulfitagarplatte nach Wilson und Blair

von

Prof. Dr. H. Großmann und Dr. A. Belling

Arbeiten, im Jahre 1944 an einem hygienischen Universitätsinstitut ausgeführt

In Mitteilung I haben wir bereits kurz darauf hingewiesen, daß wir zur Feststellung von Typhus-Paratyphusbakterien in Trinkwasser mit Erfolg den Wismutsulfitagar nach Wilson-Blair benutzt haben.

Dieser in Deutschland noch wenig bekannte Nährboden stellt ein für die Salmonellagruppe, insbesondere für Typhusbakterien selektives Nährsubstrat dar, das auch nach unseren Erfahrungen einen viel häufigeren Nachweis dieser Keime ermöglicht, als dies mit anderen üblichen Methoden der Fall ist. Wir haben die Wilson-Blairplatte bei der täglichen Stuhl-Urindiagnose mit bestem Erfolg angewandt. Die selektive Wirkung beruht darauf, daß Wismutsulfit in Anwesenheit eines Natriumsulfitüberschusses das Wachstum von Colibakterien und anderen Begleitbakterien verhindert bzw. vermindert. Gleichzeitig wird Wismutsulfit in Anwesenheit von Dextrose durch Typhus-Paratyphusbakterien zu schwarzem Sulfid reduziert. Colibakterien kommen also entweder überhaupt nicht oder nur in uncharakteristischen Kolonien zum Wachstum (s. Abb. 1). Auch Proteusbakterien entwickeln sich nicht oder sie wachsen als O-Form in grünen Kolonien ohne Schwärzung. Über ausgezeichnete Erfahrungen bei Faecesuntersuchungen unter Anwendung einer eigenen Modifikation berichten in letzter Zeit Cernozubow, Filipovic, Herrmann und Stavel. Dort findet sich auch eine ausführliche Darstellung der Entwicklung und Anwendung dieses Nährbodens. Wir selbst hielten uns im wesentlichen an die Modifikationen von Wilson-Blair von 1931 und 1933 und benutzten folgende Zusammensetzung:

Stammlösung bestehend aus:

1. 100 g Natriumsulfit auf 400 ccm aqua dest.
2. 50 g Natriumphosphat auf 100 ccm aqua dest.
3. 50 g Dextrose auf 250 ccm aqua dest.
4. 30 g Wismutammونیumcitrat in Lamellis in 200 ccm aqua dest.
10 ccm 10%-ige Natroulauge.

Auf einen Liter 3%-igen Agar kommen 200 ccm dieser Stammlösung, weiter ein Zusatz von 10 ccm einer 8%-igen Ferrosulfuricumlösung und 5 ccm einer 1%-igen Brillantgrünlösung.

In diesem Zusammenhang soll in erster Linie die Anwendung des Nährbodens auf die Untersuchung von Oberflächenwasser mit Hilfe der M. F.-Methode interessieren. Es hat sich gezeigt, daß bei Benutzung eines Agars von 1.0 bis 1.5 % der Nährboden für Filteroberflächenwachstum ebenso brauchbar ist, wie der von uns angewandte Endoagar für den Colinachweis. Der Agar wurde entweder regelmäßig frisch hergestellt oder nach Gebrauch nach dem von Bartels angegebenen Verfahren regeneriert.

Untersuchung des Wachstums von Goli-, Typhus-Paratyphusbakterien auf Membranfiltern

Es war zunächst unsere Aufgabe, an einer größeren Zahl von Stämmen Wachstumsprüfungen durchzuführen, um damit eine Grundlage für die Anwendung der M. F.-Methode auf die Wilson-Blairplatte zu schaffen.

Es wurden Aufschwemmungen von Reinkulturen in geeigneter Verdünnung verwandt, derart, daß eine frische Schrägagarkultur mit 10 cem NaCl-Lösung abgeschwemmt wurde und von dieser Aufschwemmung 3 Osen in 10 cem NaCl-Lösung, davon wieder 3 Osen in einen Liter NaCl-Lösung gegeben wurden. Von dieser letzten Verdünnung wurden gewöhnlich 25 cem filtriert, um genügendes und nicht zu üppiges Wachstum zu erzielen.

1. Colistämme.

a) 16 aus Flußwasser gezüchtete Stämme: kein Wachstum, hierunter 3 Stämme indolnegativ.

b) 68 aus Trinkwasser gezüchtete Stämme: bei 22 Wachstum, jedoch ohne Schwärzung und Reduktion, darunter 20 Stämme indolnegativ, einer fraglich, einer indolpositiv. Von den 46 Stämmen, die kein Wachstum zeigten, bildeten 41 Indol.

c) 27 aus Stuhl und Urin gezüchtete Stämme: bei 6 Wachstum auf Wilson-Blair.

Weitaus die Mehrzahl der Colistämme ging also auf Wilson-Blair nicht an (Alter der Platten durchschnittlich 3 Tage, Bebrütung über +0^h. 37^o). Die meisten der Stämme, die Wachstum zeigten, ließen zugleich die Fähigkeit der Indolbildung vermissen.

2. Typhus-Paratyphusstämme.

25 Typhusstämme, frisch aus Stuhl und Urin gezüchtet,

1 Paratyphus-B-Stamm, frisch aus Wasser gezüchtet,

1 Paratyphus-C-Stamm, Laboratoriums-stamm.

Alle Stämme zeigen Wachstum (Züchtungsbedingungen wie oben). Folgende Wachstumsformen der Typhen lassen sich unterscheiden:

1. Schwarze Kolonien mit metallisch-schwarzer Verfärbung der Umgebung Band und Reduktion (s. Abb. I).

2. Grüne Kolonien mit hellem Hof.

3. Braun-grüne Kolonien mit schwarzem Zentrum.
 4. Grüne Kolonien, schwarzes Zentrum, schwarzer Hof.
 5. Braune Kolonien mit schwarzem Zentrum und schwarzem Rand.
 6. Schwarze Kolonien ohne Hof, oder mit nur sehr schwach ausgebildetem Hof, coliähnlich.
- Unterhalb dieser Formen kommen mancherlei Übergänge vor.
Paratyphus B und C zeigen schleimige braune Kolonien mit schwarzem Rand und Reduktion

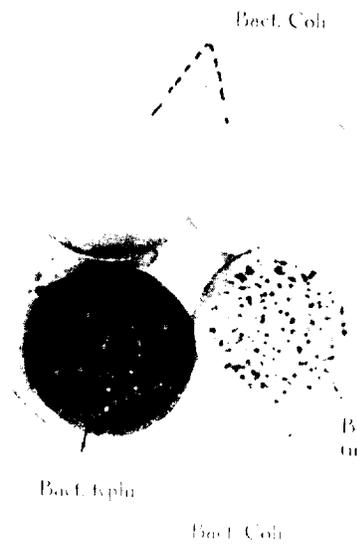


Abb. 1

Typhus- und Colibakterien auf Wismutsulfitagar mit Membranfilter.

Typhusbakterien: grüne Kolonien mit dunklem Zentrum schwarzer Umgebung (Reduktion)
 indolnegative Colibakterien: schleimige schwarze Kolonien, keine Schwarzfärbung der Umgebung.
 echte Colibakterien: ohne Wachstum (Bebrütung: 40^h bei 37°)

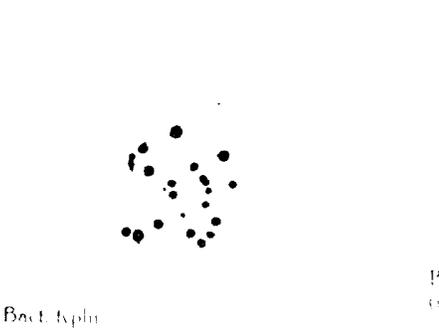


Abb. 2

FI.-Phänomen
 (schwarze Flecken auf dem Agar)
 bei Typhusbakterien, dagegen nicht bei Colibakterien (Bebrütung: 40^h bei 37°)
 (Nährboden ohne Filter)

Als ein diagnostisch vielleicht wichtiges Merkmal bei sämtlichen hier untersuchten Stämmen aus der Salmonellagruppe möchten wir die Ausbildung von mehr oder weniger schwarzen bis braunen Flecken an der Stelle des Koloniewachstums auf dem Agar auffassen. Dieses Phänomen ist u. U. erst nach längerer Bebrütung deutlich ausgeprägt. Es ist auch dann zu beobachten, wenn einzelne Kolonien nur grünes Wachstum zeigen (s. ob. 2.). Dadurch kann also die Aufmerksamkeit auf das Vorliegen von Typhus-Paratyphusbakterien gelenkt und Anlaß zu weiterer Untersuchung gegeben werden, wenn das Koloniebild nicht auf solche Keime hinweist. Durch vorsichtiges Abheben des Filters (s. Abb. 2) kann man sich leicht von der Lage des Agarfleckes und der zugehörigen Kolonie überzeugen, so daß die letztere abgeimpft und weiter untersucht werden kann. Demgegenüber begegneten wir bisher keinen echten Colistämmen, die das Phänomen der Fleckenbildung (= Fl.-Phänomen) gezeigt hätten. Unter den oben unter 1c angeführten 6 Colistämmen aus Stuhl und Urin mit Wachstum auf Wilson-Blair fanden sich zwei, bei denen Fleckung des Agars ebenfalls zu beobachten war. Die weiteren Untersuchungen mittels Anreicherung ergaben jedoch die gleichzeitige Gegenwart von Typhusbakterien, die in engster Symbiose mit den Colibakterien lebten, so daß das Fl.-Phänomen sehr wahrscheinlich auf die Typhusbakterien zurückzuführen war. Wir sahen bis jetzt keine Typhus- und Paratyphusstämme, die diesen Effekt nicht gezeigt hätten, auch konnten wir alle positiven Züchtungsergebnisse aus Oberflächenwasser und Trinkwasser in Verbindung mit diesem Phänomen erzielen, doch fanden sich gelegentlich dieser Untersuchungen auch Keime saprophytärer Art (Paracolibakterien, Gelbkeime), die den Agar ebenfalls fleckig veränderten (s. u.). Das schwarze oder grüne Wachstum ist auch von der Dichte der Aussaat abhängig. Der Nachteil eines zu dichten Wachstums und damit der Behinderung der Ausbildung des Fl.-Phänomens dürfte unter den praktischen Bedingungen der Trinkwasseruntersuchung allerdings kaum eine Rolle spielen. Reine Stämme, die ausschließlich grün ohne jede Reduktion wachsen, haben wir (im Unterschied zu den kroatischen Autoren) bisher nicht beobachtet. Es ist möglich, daß bei dem von uns verwandten Agar zu 1,0—1,5 % bessere Bedingungen vielleicht gerade auch bezüglich der Reduktionswirkung (Fleckenbildung) vorliegen können, als bei dem üblichen Agar zu 3 %. Die Abhängigkeit des Wachstums und des Koloniebildes von manchen geringfügig erscheinenden Faktoren ist nicht zu verkennen, so daß ein Einfluß auch auf die Ausbildung des Fl.-Phänomens wohl möglich wäre. So hat die Verwendung des Komplexsalzes Wismutammoniumcitrat in Pulverform statt in Lamellen einen

deutlich ungünstigen Einfluß auf die Reduktionsfähigkeit. Auch ist nach unseren Beobachtungen die verwendete Peptonart nicht gleichgültig.

Das besondere Augenmerk im Zusammenhang mit der Anwendung der M.F.-Methode haben wir bisher auf den

Einfluß der Dicke der Agarschicht, des Alters der Agarplatten und der Bebrütungsdauer

gerichtet. Wir unterscheiden hier Versuche mit regeneriertem und solche mit frischem Agar. Als dünne Schicht wurde eine Höhe des Agars von 1,0—1,5 mm gewählt, als dicke Schicht eine solche von 2,5—4,0 mm.

I. Regenerierter Agar.

Hierfür wurden verwandt 2 Typhusstämmen und 1 Paratyphus-B-Stamm. Für die beiden Typhusstämmen erwies sich als am günstigsten: Platten im Alter von 3 Tagen und von einer Dicke von 2—3 mm, Prüfung nach 20^h und 40^h bei 37°. Unter diesen Bedingungen war die Reduktion und das Fl.-Phänomen am ausgeprägtesten. Mehrfach war bei dicker Schicht zu beobachten, daß bei längerer Bebrütung eine Veränderung in der Stärke der Reduktion und der Schwarzfärbung eintrat, sei es, daß diese dann am deutlichsten war oder gegenüber der kürzeren Bebrütungsdauer ganz abgenommen hatte. Auch der Paratyphusstamm zeigte unter diesen Bedingungen das beste Wachstum. Stets war mit einer intensiven Reduktion und Schwärzung eine deutliche Fleckenbildung auf dem Agar verbunden, während diese bei 4 Tage alten Platten und dünner Schicht ganz oder fast ganz ausbleiben konnte, auch bei Bebrütung über 40^h. Die Polymorphie des Koloniebildes stand bei dem gleichen Stamm in direkter Abhängigkeit von der Variation der erwähnten äußeren Faktoren, also der Dicke der Agarschicht, dem Alter der Platten und der Bebrütungsdauer. Allein schon hieraus ist ersichtlich, daß die Festlegung eines bestimmten Kolonietypus, der diagnostisch sicher verwertbar wäre, kaum möglich ist.

II. Frischer Agar.

Nicht die gleichen Ergebnisse hatten wir mit frischem Agar. Hierfür benutzten wir 4 frisch aus Stuhl gezüchtete Typhusstämmen. Das Ergebnis unterschied sich insofern von dem mit regeneriertem Agar erzielt, als die günstigsten Bedingungen ganz frische Platten bei einer Bebrütungsdauer von 40^h boten. Die Schichtdicke war dabei ohne

Einfluß. Ebenfalls noch brauchbar waren Platten im Alter von 1—2 Tagen, doch machte sich hier schon ein Einfluß der Schichtdicke geltend, indem bei manchen Stämmen Reduktion und Fleckenbildung ausfielen. Bei 3 Tage alten Platten trat gutes Wachstum nur bei dicker Schicht mit schwacher Fleckenbildung ein. Das Aussehen der Kolonien war gegenüber dem bei regeneriertem Agar nicht augenfällig verschieden. Vergleichende Untersuchungen mit den gleichen Stämmen wurden allerdings nicht ausgeführt.

Dementsprechend ließen 4 aus Wasser gezüchtete Colistämme auf ganz frischen Agarplatten bei allen Schichtdicken jedes Wachstum vermissen (40^h, 37^o). Mit zunehmendem Alter der Platten zeigte sich schwaches Wachstum, jedoch ohne Reduktion und Fleckenbildung. Von 12 weiteren Colistämmen gaben 10 auf Agarplatten im Alter von 9 Tagen gutes Wachstum, ähnlich wie Typhusbazillen mit Reduktion, aber ohne Fleckenbildung.

Aus I und II ist also ersichtlich, daß das Alter der Platten mit der Ausbildung „typischer“ Kolonien und der selektiven Wirkung sehr eng verbunden ist. Das gegebene, da das sicherste und einfachste, ist die Verwendung möglichst frischer Platten, hergestellt mit frischem, nicht regeneriertem Agar. Es kann aber nicht behauptet werden, daß regenerierter Agar unbrauchbar wäre, wie oben gezeigt. Die Regenerierung bringt jedoch immer den Nachteil mit sich, daß die chemische Zusammensetzung des Agars nicht kontrollierbar ist und wechseln kann. Sie hat — wovon man sich durch laufende Kontrollen überzeugt — auf das Wachstum an sich keinen ungünstigen Einfluß; das betrifft vor allem die selektive Wirkung. Manchmal hatten wir sogar den Eindruck, daß regenerierter Agar bessere Ergebnisse brachte als frischer. Immerhin stellt die Regenerierung einen Notbehelf mit manchen Imponderabilien dar, und es ist auch nicht erwiesen, ob nicht das Hauptkennzeichen der Salmonellakultur, nämlich Reduktion und Schwarzfärbung, gelegentlich ungünstig beeinflusst werden kann. Vielleicht war auch bis zu einem gewissen Grad die Abgrenzung der oben angeführten Wachstumsformen von solchen durch Ungleichmäßigkeit der Nährböden verursachten Bedingungen abhängig, zumal wir dabei noch nicht genügend das geeignetste Alter der Platten berücksichtigten.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Der Wismutsulfitagar kann auch zur Oberflächenzüchtung mit Hilfe von Membranfiltern bei einer Konzentration von 1,0—1,5 % verwandt werden. Am besten wird der Agar jeweils frisch hergestellt,

brauchbar ist aber auch Agar, der nach dem von Bartels angegebenen Verfahren regeneriert ist. Neben anderen Faktoren ist von Einfluß auf Wachstum und selektive Wirkung das Alter der Platten, die Dicke der Agarschicht und die Bebrütungsdauer. Für frischen Agar wurde als am günstigsten ermittelt ein Alter bis höchstens 2 Tage, wobei die Schichtdicke ohne Bedeutung ist, d. h. sich in den üblichen Grenzen hält, für regenerierten Agar ein Alter von 3 Tagen und eine Schichtdicke von 2—3 mm. Eine Zeit der Bebrütung von 40^h, 37^o ist im allgemeinen ausreichend. Hierbei ist hervorzuheben: Diese Angaben wurden mit einer nur geringen Zahl von Stämmen gewonnen, sie beziehen sich nur auf die Züchtung mit Hilfe von Membranfiltern und die von uns angewandte Zusammenstellung des Nährbodens und sie berücksichtigen wohl nur einen Teil der Faktoren, die von Einfluß auf Selektivität und Wachstum sein könnten.

Die Keime der Salmonellagruppe, besonders Typhusbazillen, reduzieren den Nährboden mehr oder weniger stark, so daß durch Sulfid Schwarzfärbung hervorgerufen wird. Dem entspricht die Entstehung von schwarzen, braunen Flecken auf dem Agar unter dem Filter (Fl-Phänomen). Möglicherweise kann dies ein Kennzeichen der Keime der Salmonellagruppe und damit vielleicht von differentialdiagnostischer Bedeutung sein, mindestens muß es zu weiterer Untersuchung solcher Kolonien veranlassen. Wenngleich sich manche Wachstumsformen feststellen lassen, so ist die Polymorphie des Koloniebildes bei der Salmonellagruppe, besonders den Typhusbakterien, doch so ausgeprägt und von äußeren Faktoren abhängig, daß man von einem bestimmten zu fordernden „Kolonietypus“ nicht sprechen kann. Um alle positiven Keime zu erfassen, ist es notwendig, alle verschiedenen und möglichen diagnostischen Merkmale, die sich aus Züchtung und Übung ergeben, zu berücksichtigen.

Diese noch unvollständigen Untersuchungen sollen zugleich die Anregung zu weiterer Bearbeitung mancher noch offenen Frage geben, z. B. der des Einflusses der p_H-Konzentration, des Redoxpotentials, der Einwirkung symbiotischer Vorgänge usw.

Trotz dieser Einschränkungen, die wir uns selbst machen müssen, haben wir dieses Verfahren bereits mit großem Erfolg bei der

Untersuchung von Oberflächenwässern

angewandt. Diese Untersuchungen wurden während des Jahres 1944 in einem Gebiet vorgenommen, in dem der Typhus abdominalis endemisch stark verbreitet war. In der Regel wurden 10 cem, 50 cem

und 100 ccm Wasser filtriert. Die zu filtrierende Menge ist auch von dem Grad der Verunreinigung der Probe abhängig. Ist diese als hoch anzunehmen, dann wird man schon mit 1 ccm beginnen. Im Verlauf der Untersuchungen sind wir dann zur Anreicherung von verdächtigen Kolonien oder ganzen Filterteilen in flüssigem Substrat (Galle, Müller-Kauffmann) übergegangen. (s. u.)

I. Flußwasser.

Zur Feststellung der Verunreinigung eines Flußabschnittes wurden an verschiedenen Stellen 12 Proben entnommen, wobei Abwasser-einläufe und deren Umgebung besonders berücksichtigt wurden. Die Keimzahlen bewegten sich, je nach der örtlichen Verunreinigung, zwischen 160 und 17 600 000 pro 1 ccm, die Colititer zwischen 0,09 und 0.0005. Am Einlauf eines Baches, der Abwässer abführte, und dicht unterhalb wurden in 3 Proben Typhusbakterien, einmal zugleich auch (in der Mitte des Flusses) Paratyphus-B-Bakterien gezüchtet. Es wurde regelmäßig das Fl.-Phänomen beobachtet. Diese Feststellungen gaben Veranlassung, das Flußwasser auch im Bereich einer viel-benutzten Freibadeanstalt zu untersuchen. Es wurden gegen Ende Juli und zu Anfang August, also zurzeit der stärksten Badefrequenz Proben entnommen.

Probe I:

aus 10 ccm gezüchtet Typhus- und Paratyphus-B-Bakterien.
aus 1 ccm gezüchtet Paratyphus-B-Bakterien.

Probe II:

aus 1 ccm und 10 ccm Typhusbakterien gezüchtet, z. T. erst nach Anreicherung in Müller-Kauffmann.

Ein epidemieartiges Anschwellen von Typhus- und Paratyphuserkrankungen, die mit dem Flußbad in Zusammenhang hätten gebracht werden können, war nicht zu beobachten. In allen anderen Proben fanden sich verdächtige Keime, die z. T. ein positives Fl.-Phänomen ergaben, biochemisch und serologisch aber nicht als Angehörige der Salmonella-Gruppe identifiziert werden konnten (vgl. o.). Bereits bei diesen ersten Untersuchungen fiel uns das gehäufte Auftreten von Gelbkeimen auf. Gerade diese erwecken nicht selten den Verdacht auf Keime der Salmonellagruppe.

II. Abwasser.

a) S.-Bach.

Das oben angegebene Vorkommen von Typhus-Paratyphuskeimen in der Nähe des Einlaufes von Abwässern gab Veranlassung, diesen

Bach eingehend in seinem ganzen Verlauf zu untersuchen. Er entspringt einem Sumpf in der Nähe eines Sees und durchfließt in offenem Lauf Felder, Siedlungen, Gemüsegärten etc. Am unteren stark besiedelten Teil ist der Bach 0,5 bis 2,5 m breit und 0,1 bis 0,5 m tief. Auch der mittlere Lauf ist besiedelt, während dies am Oberlauf nicht der Fall ist. Die Untersuchungen wurden in drei Etappen im Abstand von einer bis drei Wochen vorgenommen, und zwar zuerst der Unterlauf mit 10 Proben, der Oberlauf mit 12 und der Mittellauf mit 11 Proben. Insgesamt wurden also 33 Proben entnommen. Zur Züchtung bedienten wir uns vermehrt der Anreicherung, wie oben schon angegeben. Es muß aber gesagt werden, daß damit, soweit wir dies schon beurteilen können, bei sehr hohem Keimgehalt, wie er bei konzentrierten Abwässern vorliegt, auch ein Nachteil verbunden sein kann, nämlich der, daß es in manchen Fällen auch mittels Anreicherung schwer gelingt, eine enge Symbiose, die durch die Filtration wohl gefördert wird, zu lösen. Dann ist ein wiederholter Wechsel der Anwendung von flüssigen und festen Nährböden erforderlich, wenn man zum Ziel kommen will; oder es ist ratsam, kleinere Mengen wiederholt unter Verwendung großer Filter mit 90 mm Durchmesser zu untersuchen. Das kann natürlich eine unerfreuliche Verzögerung im Untersuchungsverlauf bedeuten.

Die meisten positiven Befunde wurden im Unterlauf des Baches erhoben, weniger fielen im Mittellauf an und der Oberlauf wurde als von pathogenen Keimen der Salmonella-Gruppe frei befunden.

Unterlauf:

Die höchste Keimzahl pro cem war 98 000, die niederste 660, der Coliliter lag zwischen 0,001 und 0,5. Von 10 Proben waren 9 positiv, und zwar fanden sich Typhusbakterien allein 3mal und 6mal Typhusbakterien zusammen mit Paratyphus-B-Bakterien.

Mittellauf:

Höchste Keimzahl 1 750 000, niederste 80, Colititer zwischen 0,0002 und 1,5. Von 11 Proben waren 6 positiv, darunter fanden sich einmal neben Typhusbakterien zugleich Paratyphus-B-Bakterien.

Untersuchungshergang bei den Proben 4 und 6:

Probe 4: Filtriert 50 cem, Keimzahl 1 057 000, Colititer 0,0002. Filter sehr stark bewachsen, grüne Kolonien mit schwarzem Zentrum, FL-Phänomen positiv. Die Abimpfung auf Endoagar ergab biochemisch das Verhalten von Keimen aus der Coligruppe. Da dennoch der dringende Verdacht des Vorliegens von Keimen der Salmonella-gruppe bestand, wurde in Galle angereichert. Erst nach wieder-

holter Abimpfung auf feste Nährböden und Gallenreicherung im Wechsel wurden Reinkulturen gezüchtet, die serologisch und biochemisch sich als einwandfreie Typhusbakterien und Paratyphus-Bakterien herausstellten. Außerdem waren diese Keime mit typischen Gelbkeimen vergesellschaftet.

Probe 6: Keimzahl 1 500 000, Colititer 0,0005, bei 50-ccm-Filtration dichtes Wachstum von grünen Kolonien, Fl.-Phänomen negativ. Bei 10-ccm-Filtration verdächtige Kolonien, Fl.-Phänomen positiv, Abimpfung in Galle, Aussaat auf Wilson-Blair ergibt typische Typhusbakterien neben anderen als Paracolibakterien angesprochenen Keimen.

Bei anderen positiven Proben war der Entwicklungsgang ähnlich, wenn auch nicht so langwierig wie bei Probe 4. Bei geringem Keimgehalt war die Anreicherung zum Zwecke der Reinigung der Kolonien in der Regel nicht erforderlich.

Wie bereits oben erwähnt, kann bei sehr dichtem Wachstum die Reduktion und damit auch das Fl.-Phänomen unterdrückt werden. Es ist daher stets notwendig, auch kleinere Wassermengen zu filtrieren, um Kolonien mit allen „typischen“ Merkmalen zu erfassen. Auffallend häufig war die Verbindung von Typhen mit Gelbkeimen, sowohl im Unterlauf wie im Mittellauf, was den Flußwasser-Beobachtungen entspricht. Bei 14 positiven Befunden wurden 11mal zugleich Gelbkeime gezüchtet. Aber auch der Oberlauf ohne Typhusbefunde war nicht frei von diesen Keimen (s. u.). Die Gelbkeime gehören also nicht oder nicht alle zu denen, die durch den Wismutsulfitagar unterdrückt werden, ebensowenig manche Colikeime, die wir zu den Paracolibakterien rechnen. Ob sich darunter nicht farblose Abkömmlinge von Gelbkeimen befinden, steht dahin.

Oberlauf:

Unter den in diesem Bereich untersuchten 12 Proben fanden sich in keiner Angehörige der Salmonellagruppe. Dagegen begegneten wir bei 11 Proben verdächtigen Keimen, die auch fl.-positiv waren. Hierunter befanden sich 6 mal Gelbkeime. Es ist nicht gelungen, aus solchen Kolonien Typhus- oder Paratyphusbakterien zu züchten. Gelbkeime scheinen sich bezüglich des Fl.-Phänomens verschieden zu verhalten. Keiner dieser Stämme hatte agglutinatorisch Beziehungen zur Salmonella-Gruppe, es fanden sich darunter indol-positive wie indol-negative. Weitere Untersuchungen zu dieser Frage sind notwendig.

Diese unter I und II a wiedergegebenen Befunde fassen wir folgendermaßen zusammen:

Im Zusammenhang mit der Einleitung von nicht geklärten Abwässern in einen großen Vorfluter und der Untersuchung einer Frei-

badeanstalt wurden unter 14 in 5 Flußwasserproben Typhusbakterien. 2 mal zugleich mit Paratyphus-B-Bakterien nachgewiesen. Zum Zweck der Aufdeckung von Infektionsquellen wurde der Abwasser abführende Bach S im ganzen Verlauf systematisch untersucht. Von 33 Proben erwiesen sich 14 als sicher positiv für Typhusbakterien, darunter 7 mal zugleich als positiv für Paratyphus-B-Bakterien. Negativ waren also 19 Proben. Hierunter befanden sich 4, die ein völlig unverdächtiges Wachstum zeigten, während fast alle übrigen negativen Proben Keime enthielten, die auf der Wilson-Bairplatte mehr oder weniger ähnlich den Keimen der Salmonellagruppe wuchsen und sich auch fl.-positiv verhielten, wie dies bei den sicher positiven Befunden stets der Fall war. Sehr häufig in Verbindung mit Typhen, aber auch ohne dieses Vorkommen wurden Gelbkeime gezüchtet.

Als weiteres epidemiologisch wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungen ist festzustellen, daß im Bereich des Mittellaufes des Baches S in den anliegenden Siedlungen 15 Typhuskeimträger ermittelt werden konnten.

b) Bach H.

Es handelt sich um einen meist offenen Abwasserablauf aus einem Fabrikgelände, der die Abwässer aus einer Industriegasfabrik, Spülaborten und Waschräumen, ferner Zuläufe aus Regenwasserkanälen und aus einer Sauerkohlfabrik aufnimmt. Der „Bach“ mündet nach längerem Verlauf in den oben angeführten Fluß.

In einem unterhalb des Fabrikgeländes anliegenden Wohnhaus war eine Typhuserkrankung vorgekommen. Der dort vorbeifließende Bach hatte alle Abwässer aus dem Fabrikgelände aufgenommen. In 2 hieraus entnommenen Proben fanden sich Typhusbakterien zusammen mit Paratyphus-B-Bakterien. Dieser Befund gab Veranlassung zu einer Untersuchung des oberen Abwasserlaufes innerhalb und in nächster Nähe des Fabrikgeländes. An verschiedenen Stellen wurden 8 weitere Proben entnommen. In 3 von diesen Proben wurden Typhusbakterien einmal zugleich Paratyphus-B-Bakterien nachgewiesen. Die Proben waren alle sehr keimreich, der Colititer war durchweg sehr hoch. Filtriert wurden 1 und 10 cem. In den 3 positiven Fällen gelang der Nachweis ohne Schwierigkeiten und prompt nach Anreicherung von verdächtigen Einzelkolonien bzw. Filterstückchen mit verdächtigen Kolonien in Galle. Neben den pathogenen Keimen fanden sich regelmäßig reichlich Gelbkeime, einmal auch Paracolibakterien. Von den 5 negativen Proben enthielten 2 Gelbkeime, 2 andere nur Paracoli-

bakterien ohne Verdacht. An den meisten Gelbkeimkulturen fiel eine starke O-Agglutination auf, die z. T. den Endtiter erreichte, dagegen wurden die Stämme durch kein H-Antiserum nennenswert beeinflusst.

Es ist also auch hier mit unserem Verfahren der Nachweis von pathogenen Darmbakterien gelungen.

Gesamtbeurteilung und Ausblick

Die Membranfiltermethode in Kombination mit dem Wismut-sulfitagar nach Wilson-Blair stellt eine wertvolle Bereicherung der bakteriologisch-diagnostischen Hilfsmittel im Rahmen der Wasser-Hygiene, damit vor allem einen beachtenswerten Fortschritt in der Typhus-Paratyphusbekämpfung dar. Wenn das Verfahren auch noch der weiteren Ausarbeitung bedarf und in seinen Möglichkeiten noch nicht erschöpft ist, so läßt sich doch schon sagen, daß die selektiven Eigenschaften des richtig hergestellten und angewandten Wilson-Blairagars durch gleichzeitige Keimanreicherung mittels Filtration maximal ausgenutzt werden; man hat dadurch die Möglichkeit, größere Wassermengen zur Untersuchung zu bringen, als dies mit anderen Untersuchungsverfahren zurzeit geschehen kann, ist dabei allerdings, soweit vorläufig zu beurteilen, an gewisse Nachteile gebunden. Diese dürften jedoch von untergeordneter Bedeutung sein. Die Verbindung der M.-F.-Methode mit der Wilson-Blairplatte scheint zur Zeit wohl das beste Verfahren des Nachweises von Keimen der Salmonellagruppe in Wässern aller Art zu sein.

Während der Durchführung dieser Arbeiten berichteten Cernozubov, Filipovic und Stavel über „Untersuchung von Oberflächenwasser und Abwasser mittels des Bismut-Sulfit-Nährbodens nach Wilson-Blair auf Salmonella-Typhi und andere Salmonella-Bakterien“. Die Autoren brachten Wasser in einer Menge von 0,2 bis 0,5 bis 1,0 bis 2,0 ccm auf Platten zur Verdunstung. Auf diese Weise fanden sie in 102 von 221 Abwasseruntersuchungen der Stadt Agram (= 46,1%). Keine der Salmonellagruppe, in erster Linie Typhusbakterien, häufig aber auch andere Arten und mehrere zugleich. Typhusbakterien fehlten jedoch niemals. Von 168 Kanalwasserproben waren 82 positiv für Typhus und Paratyphus.

Wir selbst hatten unter bisher 43 Abwasserproben 19 positive, unter 14 Flußwasserproben 5 positive. Die Ergebnisse dürften sich an Häufigkeit ungefähr entsprechen. Die Güte des Verfahrens läßt sich aber durch einen Vergleich der positiven Befundzahlen allein nicht beurteilen, hierin müßten die Gunst bzw. Ungunst der örtlichen Ver-

hältnisse, also die hygienischen Bedingungen miteinbezogen werden. Unsere bisherigen Ergebnisse bauten sich auf zufälligen Hinweisen auf. Eine systematische Durchuntersuchung des Kanalnetzes einer Großstadt und weiterer Oberflächenwässer war geplant, kam aber nicht zur Ausführung. Wir möchten als so gut wie sicher annehmen, daß sich die positive Zahl dann noch wesentlich erhöht hätte, wenn wir die besonderen örtlichen Umstände dabei im Auge haben. Nach ihren Angaben haben die kroatischen Autoren höchstens 3—4 ccm Wasser untersucht, also viel geringere Mengen, als sie von uns angewandt wurden. Wir halten es für wahrscheinlich, wenn auch noch nicht für erwiesen, daß die Verwendung größerer Wassermengen eine Steigerung der Zahl der positiven Resultate zur Folge hat, wie dies beim Colinachweis in Trinkwasser sicher ist (siehe Mitteilung I). Das ist vielleicht weniger bei konzentrierten Abwässern, als bei Flußwasser, Badewasser, See- und Teichwasser der Fall. Die Entscheidung hierüber können nur weitere Erfahrungen bringen. Davon abgesehen aber ist unser Verfahren bei mindestens gleicher Leistung dem Verdunstungs- und anderen Verfahren schon deswegen überlegen, weil es wesentlich schneller, einfacher und billiger arbeitet: Schneller, weil ein Zeitverlust durch Verdunsten oder Absetzenlassen (Niederschlagsmethoden) nicht eintritt; einfacher, weil die erforderliche Apparatur lediglich im Filtrierapparat mit Zubehör und Thermostat besteht, und der Verbrauch an Kulturplatten, damit auch der erforderliche Brutrauminhalt wesentlich geringer ist; billiger, weil der Verbrauch an Glas- und Nährmaterial geringer ist.

Wäre die bakteriologisch-serologische Diagnose nicht gesichert, so möchte man ein derart gehäuftes Vorkommen von Darminfektionserregern in Oberflächenwässern, das durch systematische Arbeit sich wohl noch erweitert hätte, fast für unwahrscheinlich halten. Da nun aber an dieser Tatsache nicht vorübergegangen werden kann, so muß sie in die epidemiologische Betrachtung miteinbezogen werden. Wie schon erwähnt, handelt es sich um ein mit Typhus stark durchseuchtes Gebiet. Daß bei einer derartigen Verbreitung der Erreger viele Menschen direkt oder indirekt mit diesen in Kontakt kommen, läßt sich nicht bezweifeln, und ist z. T. sicher erwiesen: man denke an die Verseuchung der oben erwähnten viel benutzten Flußbadeanstalt. Wenn dennoch Anzeichen einer epidemicartigen Häufung von Erkrankungen ausblieben, so dürfte sich dies zwanglos hieraus erklären, daß die vorgeschrittene natürliche Durchseuchungssimmunität in solchen Gebieten, unterstützt durch aktiven Impfschutz, wohl gegen gehäufte Erkrankungen schützt, aber nicht gegen Einzelerkrankungen. Zugleich aber

besteht die Gelegenheit des vermehrten Aufkommens nicht erkannter gesunder Keimträger, die für die Verbreitung der Erreger in der Außenwelt mehr und mehr sorgen; dies wird durch die Ermittlung von 15 Keimträgern im Bereich des Baches S offenkundig. Denn ein derart massiertes Auftreten von Darminfektionserregern selbst in einem sehr großen Vorfluter setzt wohl sicher, die dauernde Abgabe von ungeheuren Keimmengen voraus. Personen ohne genügende natürliche oder künstliche Immunisierung sind daher stark gefährdet.

Wir glauben nicht zu weit zu gehen, wenn wir auf Grund unserer bisherigen Erfahrungen schon sagen: In Zukunft dürfte die Seuchenbekämpfung die Möglichkeit haben, durch die oben beschriebene einfache Methode, die bei geringem Aufwand laufende Untersuchungen gestattet, sich ständig über die Verseuchungslage der Außenwelt, soweit es sich um Gewässer handelt, auf dem laufenden zu halten. Dies kommt gewiß einer leichteren und schnelleren Erfassung von Keimträgern und Verbesserungen in der Abführung von Abwässern zugute, aber auch der vermehrten Sicherung von Trinkwasseranlagen. Durch die verbesserte Methodik wird in Zukunft wohl mancher Seuchenherd, der zu Wasser irgendwelcher Art in Beziehung steht und vielleicht nicht erkannt worden wäre, erfaßt werden können: einen Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme bietet die erwähnte Erfassung von bisher unbekanntem Keimträgern. Die Erfahrung wird lehren müssen, wie viel das neue Untersuchungsverfahren zu einer erfolgreichen Bekämpfung dieser Seuchen, gemessen an einer Herabsetzung der Morbidität, beitragen kann.

In diesem Zusammenhang kommen wir nochmals auf die in Mitteilung I erwähnten Trinkwasseruntersuchungen zurück. Wir hatten unter 1465 Untersuchungen 2 mal Paratyphus-B-Bakterien in der Leitung des Zentralwasserwerkes einer Großstadt, unter 130 Untersuchungen von Einzelrohrbrunnen 2 mal Typhusbakterien, 1 mal Typhusbakterien gemeinsam mit Paratyphus-B-Bakterien und 1 mal Paratyphus-B-Bakterien allein, unter 235 Untersuchungen von Einzelschachtbrunnen 3 mal Typhusbakterien und 2 mal Paratyphus-B-Bakterien gefunden. Diese Befunde stellen erst einen Anfang dar, zumal wir noch nicht allgemein die Wilson-Blairplatte in die Untersuchungen miteinbezogen hatten. Auch Cernozubov und Mitarbeiter teilen die Züchtung von Typhusbakterien aus Trinkwasser unter Verwendung der Wilson-Blairplatte mit. Hier macht sich aber das Verdunstungsverfahren als besonders umständlich und kostspielig geltend: 5 bis 10 Platten werden mit je 4 ccm Wasser beschickt (insgesamt 20—40 ccm).

Dauer der Verdunstung 3 bis 4^h. Mit unserer M.F.-Methode können dagegen beispielsweise unter günstigen Bedingungen bei Leitungswässern mit Verwendung einer einzigen Platte 400 ccm Wasser untersucht werden. Bei weiterem Ausbau der Methode scheint es uns nicht unmöglich, daß in der Trinkwasserhygiene nicht mehr der Nachweis von Colibakterien, sondern der von Angehörigen der Salmonellagruppe die Hauptrolle spielen wird, ja, daß jener durch diesen vielleicht ganz verdrängt werden kann. Als bakteriologischer Maßstab für den allgemeinen Reinheitsgrad einer Trinkwasseranlage könnte die Gesamtkeimzahl gelten, als Indikator für eine bedenkliche Verunreinigung der Nachweis von Angehörigen der Salmonellagruppe, denn der Colinachweis allein bedeutet bekanntlich, wie die Erfahrung längst gelehrt hat, durchaus nicht immer einen Alarmzustand allerhöchsten Grades. Die Einstellung zu dieser Frage ist natürlich von der weiteren Entwicklung bzw. den sich hieraus ergebenden Erkenntnissen abhängig, wir halten es aber jetzt schon für angezeigt, neben dem regelmäßigen Nachweis von Colibakterien auch den von pathogenen Darmbakterien der Salmonellagruppe in die Wasseruntersuchung miteinzubeziehen, besonders dann, wenn es sich um hygienisch nicht einwandfreie Verhältnisse handelt.

Schlußzusammenfassung.

1. Es werden die wesentlichen Eigenschaften des Wismutsulfidnährbodens nach Wilson-Blair kurz beschrieben.
2. An Hand der Untersuchung von 111 Colistämmen der verschiedensten Herkunft, von 25 Typhusstämmen und 2 Paratyphusstämmen wird gezeigt, daß die Wilson-Blairplatte auch der Membranfiltermethode nutzbar gemacht werden kann, wobei ein Agar zu 1,0—1,5 % Konzentration zu verwenden ist.
3. Es wird das sog. Fl.-Phänomen beschrieben, darin bestehend, daß durch Kolonien von Keimen der Salmonellagruppe der Agar schwarz-braun gefleckt wird. Dieses Phänomen scheint allen Keimen dieser Art zuzukommen, soweit die bisherigen Untersuchungen Schlüsse zulassen; die Frage seiner differentialdiagnostischen Bedeutung wird erwohnen. Bei symbiotischen Vorgängen kann das Phänomen durch Keime, die nicht zur Salmonellagruppe gehören, vorgetäuscht werden.
4. Bei Typhus- und Paratyphusstämmen werden mehrere Wuchsformen unterschieden. Ein fest umrissener, allgemein gültiger Kolonietypus läßt sich bei Typhusbazillen nicht aufstellen.

5. Es wird der Einfluß des Alters der Agarplatten, der Dicke der Agarschicht und der Bebrütungs-dauer auf das Wachstum bei regeneriertem und frischen Agar untersucht und beschrieben.

6. Die M.-F.-Methode in Verbindung mit der Wilson-Blair-platte wurde mit Erfolg bei der Untersuchung von Trinkwasser, Flußwasser und Abwasser angewandt. Einzelheiten der Technik und Hergang der Untersuchung bei einigen Fällen werden beschrieben. Häufig wurden in Fluß- und Abwasserproben (19 mal unter 43) Typhus- und Paratyphusbakterien, oft beide Keimarten zugleich, nicht selten auch in Trinkwasserproben (11 mal), nachgewiesen. Auf Grund von positiven Typhusbefunden in Abwasserproben 15 Keimträger ermittelt.

7. Der weitere Ausbau der Methode wird als notwendig bezeichnet, ihre Anwendung in der Seuchenbekämpfung jetzt schon als zweckmäßig empfohlen. Der Schilderung der bisher erzielten Ergebnisse werden epidemiologische Erörterungen angeschlossen, es werden die Vorteile aufgezeigt, die sich für die Seuchenbekämpfung hieraus ergeben können. Die Methode wird als z. Zt. wohl bestes Verfahren des Nachweises von Keimen der Salmonellagruppe in Wässern aller Art gekennzeichnet.

8. Die Vorteile des Verfahrens werden dem von Cernozubov und Mitarbeitern für den gleichen Zweck erfolgreich angewandten Verdunstungsverfahren gegenübergestellt.

Schrifttum.

1. Großmann u. Beling, siehe obige Mitteilung I.
2. Cernozubow, Filipovic, Herrmann u. Stavel, Z. Hyg. 125, 510 (1944).
3. Cernozubow, Filipovic u. Stavel, Z. Hyg. 125, 493 (1944).
4. Lovrehowich, Bismutsulfitagar nach Wilson und Blair (1941).